



**Уральский
федеральный
университет**

имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина

**Химико-
технологический
институт**

**Н. Е. МАКСИМОВА
Н. Н. МОЧУЛЬСКАЯ
В. В. ЕМЕЛЬЯНОВ**

ОСНОВЫ ИММУНОАНАЛИЗА

Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

Н. Е. Максимова, Н. Н. Мочульская, В. В. Емельянов

ОСНОВЫ ИММУНОАНАЛИЗА

Учебное пособие

Рекомендовано методическим советом
Уральского федерального университета в качестве учебного пособия
для студентов вуза, обучающихся по направлению подготовки
19.04.01 «Биотехнология»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2021

УДК 606:61(075.8)
ББК 30.16я73-1
М17

Под общей редакцией Н. Н. Мочульской

Рецензенты:

лаборатория морфологии и биохимии
Института иммунологии и физиологии УрО РАН
(заведующий лабораторией доктор биологических наук, доцент *И. Г. Данилова*);
С. С. Дерябина, кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией молекулярной диагностики
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»»

Максимова, Н. Е.

М17 Основы иммуноанализа : учебное пособие / Н. Е. Максимова, Н. Н. Мочульская, В. В. Емельянов ; под общ. ред. Н. Н. Мочульской ; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2021. — 148 с. : ил. — Библиогр.: с. 147. — 30 экз. — ISBN 978-5-7996-3295-3. — Текст : непосредственный.

ISBN 978-5-7996-3295-3

В учебном пособии рассмотрены современные иммунохимические методы анализа с использованием различных способов детекции. Изложены принципы, основные характеристики, варианты практического применения, достоинства и ограничения каждого метода. Описаны строение, свойства и методы получения основных типов иммунореагентов, применяемых в иммуноанализе, — антигенов, антител, комплемента, конъюгатов (меченых иммунореагентов). Уделено внимание основным физико-химическим закономерностям взаимодействия антигена с антителом.

Для магистрантов, обучающихся по направлению «Биотехнология» и осваивающих дисциплины «Основы иммуноанализа» и «Иммунохимические и молекулярно-генетические методы анализа», а также бакалавров, обучающихся по направлениям «Биотехнология» и «Химическая технология» и осваивающих курс «Основы иммунохимии».

УДК 606:61(075.8)
ББК 30.16я73-1

ISBN 978-5-7996-3295-3

© Уральский федеральный университет, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

От авторов.....	5
Список принятых сокращений.....	6
Введение.....	7
1. Реагенты для иммунохимического анализа.....	8
1.1. Антигены.....	8
1.1.1. Свойства антигенов.....	11
1.1.2. Антигены бактериальной клетки.....	16
1.1.3. Антигены вирусов.....	18
1.1.4. Антигены организма человека.....	19
1.1.5. Антигенные диагностикумы.....	23
1.2. Антитела.....	25
1.2.1. Строение антител.....	25
1.2.2. Изотипы, аллотипы и идиотипы.....	30
1.2.3. Характеристика классов антител (изотипов).....	30
1.2.4. Методы получения антител.....	35
1.2.4.1. Поликлональные антитела.....	36
1.2.4.2. Моноклональные антитела.....	38
1.3. Система комплемента.....	42
1.3.1. Биологические функции системы комплемента.....	43
1.3.2. Активация системы комплемента.....	43
1.4. Конъюгаты — меченые иммунореагенты.....	46
2. Физико-химические основы взаимодействия антигена с антителом.....	59
2.1. Закономерности взаимодействия Ag — Ат.....	59
2.2. Аффинность и авидность.....	69
3. Методы иммунохимического анализа.....	71
3.1. Методы без использования меток (меченых реагентов).....	71
3.1.1. Реакция преципитации.....	71
3.1.1.1. Реакция кольцепреципитации.....	73
3.1.1.2. Реакция преципитации в геле.....	74
3.1.1.3. Реакция флоккуляции.....	76
3.1.2. Реакция агглютинации.....	77
3.1.3. Иммуноэлектрофорез.....	89
3.1.3.1. Ракетный иммуноэлектрофорез.....	92

3.1.3.2. Встречный иммуноэлектрофорез (электросинерез).....	94
3.1.3.3. Перекрестный (двумерный) иммуноэлектрофорез.....	95
3.1.4. Реакция нейтрализации.....	98
3.1.5. Реакции связывания комплемента.....	100
3.1.5.1. Реакция радиального гемолиза.....	104
3.1.5.2. Реакция иммунного прилипания.....	105
3.2. Методы с использованием меток (меченых реагентов).....	106
3.2.1. Радиоиммунный анализ.....	106
3.2.2. Флуоресцентный иммунный анализ.....	111
3.2.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ.....	114
3.2.4. Иммуноферментный анализ.....	117
3.2.5. Иммуноблоттинг.....	136
3.2.6. Иммунохроматографический анализ.....	139
Библиографический список.....	147

ОТ АВТОРОВ

В основу настоящего учебного пособия положен курс лекций «Иммунохимические и молекулярно-генетические методы анализа», который читается в Химико-технологическом институте УрФУ. Пособие предназначено для магистрантов, обучающихся по магистерским программам «Молекулярная биотехнология и биоинженерия», «Клеточные и генные технологии в косметологии, фармацевтике и медицине будущего», и студентов бакалавриата, обучающихся по направлению «Биотехнология».

Включение курса «Иммунохимические и молекулярно-генетические методы анализа» в учебные планы связано с широким использованием данных методов не только в медицине, но и в смежных областях науки, с разработкой новых научных направлений на стыке иммунологии и биотехнологии, иммунологии и экологии.

Курс ориентирован главным образом на магистрантов, обладающих хорошей подготовкой по таким базовым дисциплинам, как микробиология, биохимия, биотехнология, знакомых с основами иммунохимии и молекулярной биологии, а также с современными физико-химическими методами исследования, владеющих навыками работы на лабораторных приборах.

Состоит учебное пособие из трех глав. В первой главе описаны особенности строения основных типов иммунореагентов, применяемых в иммуноанализе: антигенов, антител, комплемента, конъюгатов (меченых иммунореагентов), охарактеризованы их свойства и методы получения. Вторая глава посвящена взаимодействию антигенов с антителами. В третьей главе, самой объемной, рассматриваются основные методы иммуноанализа.

Авторы настоящего учебного пособия ставят своей задачей помочь студентам свободно ориентироваться в разнообразии широкого спектра современных иммунохимических и молекулярно-генетических методов анализа, их аналитических и сравнительных характеристиках, сформировать навыки грамотного подбора оптимальных методических средств в зависимости от поставленных исследовательских или практических задач.

Представленные в пособии материалы структурированы по единому плану: сначала излагается принцип рассматриваемого метода, далее следует краткое описание постановки эксперимента, затем приводятся варианты его практического использования и, наконец, указываются достоинства и ограничения.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Аг — антиген, антигены

Ат — антитело, антитела

ГАТ — гипоксантин — аминоптерин — тимидин

БСА — бычий сывороточный альбумин

ИФА — иммуноферментный анализ

ИХА — иммунохроматографический анализ

мАт — моноклональные антитела

пАт — поликлональные антитела

ПХ — пероксидаза хрена

ПЭГ — полиэтиленгликоль

РИА — радиоиммунный анализ

РСК — реакция связывания комплемента

ЩФ — щелочная фосфатаза

CD (Cluster of Differentiation) — кластер дифференциации

Е (Enzyme) — фермент

МНС (Major Histocompatibility Complex) — главный комплекс гистосовместимости

ВВЕДЕНИЕ

Иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом взаимодействии антигенов со специфическими антителами, прочно вошли в аналитическую практику. Такие методы обладают высокой чувствительностью, специфичностью, требуют минимального количества исследуемого материала, позволяют получить количественные, объективные результаты.

Иммуноанализ используют с диагностическими целями практически во всех областях медицины, а также в ветеринарии. Методы иммуноанализа с успехом применяют в молекулярной биологии, микробиологии, физиологии для изучения живых систем на всех уровнях. Биотехнологи при получении, выделении и очистке биологически активных веществ из природных источников, создании генетически модифицированных организмов, контроле их качества и биобезопасности в настоящее время редко обходятся без иммунологических подходов и методов.

Методы иммуноанализа широко используют для решения широкого круга прикладных задач в микробиологической и пищевой промышленности, сельском хозяйстве, санитарной практике, судебно-медицинской экспертизе, для целей охраны окружающей среды.

1. РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1.1. Антигены

Антигены — это биополимеры, способные вызывать иммунологические реакции: синтез антител, реакции клеточного иммунитета, повышенную чувствительность, иммунологическую толерантность, иммунологическую память.

Как правило, антигенами являются высокомолекулярные вещества с характерным химическим строением. Роль антигенов могут выполнять чужеродные простые белки, сложные белки (глико-, липо-, нуклеопротеины), полисахариды, синтетические полипептиды.

Антигенные свойства отдельных веществ могут проявляться тогда, когда они входят в состав сложных систем и смесей. Поэтому термин «антиген» применяют к таким сложным системам, как микробные, растительные и животные клетки, тканевые экстракты, биологические жидкости. При этом имеются в виду отдельные содержащиеся в этих системах антигены.

Антигены могут быть инфекционными и неинфекционными, растворимыми или клеточными (корпускулярными) субстанциями.

В зависимости от происхождения различают экзоантигены и эндоантигены.

Экзоантигены попадают в организм извне алиментарным, ингаляционным или парентеральным путем. К экзоантигенам относятся микроорганизмы, трансплантированные клетки и чужеродные частицы.

Эндоантигены образуются в самом организме и подразделяются на аутоантигены и неоантигены.

Аутоантигены — это структурно не измененные молекулы, синтезируемые в организме в физиологических условиях. В норме аутоантигены не вызывают реакцию иммунной системы вследствие сформировавшейся иммунологической толерантности (невосприимчивости) либо их недоступности для контакта с факторами иммунитета — это так называемые забарьерные антигены (например, белки нервной ткани, хрусталика и сперматозоиды). При срыве толерантности или нарушении целостности биологических барьеров (наиболее частая причина — травма) компоненты иммунной системы начинают специфически

реагировать на аутоантигены выработкой специфических факторов иммунитета (аутоантител, клонов аутореактивных лимфоцитов).

Неоантигены формируются в организме в результате патологических процессов (ожоги, обморожения, вирусные и бактериальные внутриклеточные инфекции), мутаций, что приводит к появлению белковых молекул с признаками чужеродности. К неоантигенам относят и новые тканевые антигены, возникающие при образовании злокачественных опухолей.

По генетическому отношению антигены делятся на аутоантигены, изоантигены, аллоантигены и ксеноантигены.

Изоантигены (или индивидуальные антигены) — это антигены, общие только для генетически идентичных организмов, например для однояйцевых близнецов, животных инбредных линий. Примером таких антигенов в популяции людей являются антигены гистосовместимости.

Аллоантигены (или групповые антигены) — это антигены, общие для генетически не родственных, но относящихся к одному виду организмов. На основании аллоантигенов общую популяцию организмов можно подразделить на отдельные группы. Примером таких антигенов у людей являются антигены групп крови (системы АВ0 и др.).

Ксеноантигены (устаревшее — гетерологичные антигены) — это антигены тканей и клеток организмов разных видов. Например, лошадиная сыворотка является ксеногенным антигеном для человека. Как правило, ксеногенные антигены высокоиммуногенны.

По способности вызывать иммунный ответ выделяют антигены полноценные (иммуногены) и неполноценные (гаптены).

Полноценные антигены индуцируют выработку специфических факторов иммунитета и взаимодействуют с ними. По химической природе полноценные антигены — это белки (простые и сложные), полисахариды, липополисахариды, полипептиды.

Гаптены — это субстанции, которые самостоятельно иммунный ответ не вызывают, но приобретают эту способность, будучи конъюгированными с высокомолекулярными белковыми носителями или в смеси с ними.

Гаптены подразделяются на простые и сложные.

Простые гаптены — это низкомолекулярные соединения или простые химические вещества (динитрофенол, анилин, эфирные масла, никель, хром, бериллий и др.).

Сложными гаптенами могут быть липиды, нуклеиновые кислоты, олигопептиды, стероиды, лекарственные препараты и др.

Попадая в организм индивида, гаптены соединяются с его структурными и функциональными белками, приобретают свойства полноценных антигенов и индуцируют иммунный ответ.

Антитела, образующиеся к гаптену, связанному с белком, в последующем могут взаимодействовать и со свободным гаптенем. Этот прием позволяет получать антитела практически к любому химическому веществу.

В молекуле полноценного антигена выделяют две функционально разные единицы: антигенную детерминанту (синоним — эпитоп) и носитель.

Антигенной детерминантой называется часть молекулы антигена, оказывающая иммуногенное действие и способная взаимодействовать с активным центром антитела. В молекулах белков антигенная детерминанта образуется совокупностью аминокислотных остатков. Размер антигенной детерминанты белков может включать от 5–7 до 100 аминокислотных остатков.

Носителями в молекулах естественных антигенов чаще всего являются белки и полисахариды, а также липополисахариды и нуклеиновые кислоты. В искусственных антигенах роль носителей выполняют органические полимеры (синтетические полипептиды, полисахариды, полиэлектролиты и др.).

Количеством эпитопов в молекуле антигена определяется его валентность. Одна молекула антигена может иметь от нескольких единиц до нескольких сотен эпитопов разной специфичности. Так, яичный альбумин (М 42 000) имеет 5 эпитопов, то есть 5-валентен, а белок тиреоглобулин (М 680 000) — 40-валентен.

Разные эпитопы вызывают синтез антител разной специфичности. Если антиген двухвалентен, то к нему вырабатываются как минимум два вида антител, специфичных к двум эпитопам этого антигена. Если антигеном являются бактерия или вирус, то количество антител, вырабатывающихся к ним, равно суммарной валентности всех антигенных структур возбудителя. Так, ВИЧ содержит наружные антигены gp120, gp41, внутренние антигены p24, p17, p9, p7, p64 (обратная транскриптаза), p22 (протеаза), p31 (эндонуклеаза/интеграза), и ко всем этим антигенам вырабатываются антитела.

При попадании в организм антиген вступает во взаимодействие с иммунокомпетентными клетками: происходит распознавание антигена. В этом процессе ведущую роль играют лимфоциты. **По своей способности реагировать с разными популяциями лимфоцитов** и вызывать специфические иммунологические реакции антигены делятся на тимусзависимые и тимуснезависимые.

Тимусзависимые антигены — это антигены, реакция на которые генетически контролируется комплексом гистосовместимости и осуществляется с обязательным участием Т-лимфоцитов-хелперов (Тх-клеток), а также макрофагов и В-лимфоцитов. Большинство природных антигенов относятся к тимусзависимым: трансплантационные, тканеспецифические антигены, сывороточные белки, бактериальные токсины, многие антигены вирусов, антигены чужеродных эритроцитов.

Тимуснезависимые антигены — антигены, выработка антител к которым осуществляется В-клетками без участия Тх-клеток. К тимуснезависимым ан-

тигенам относятся некоторые микробные полисахариды и липополисахариды (пневмококковый полисахарид, полисахарид кишечной палочки). Эти антигены индуцируют синтез антител, в основном принадлежащих к классу иммуноглобулина М.

Для тимуснезависимых антигенов характерны наличие большого количества одинаковых эпитопов (антигенных детерминант) и большая молекулярная масса.

В процессе дифференциации на мембранах клеток системы иммунитета появляются макромолекулы, получившие название дифференцировочных антигенов, или CD-антигенов (от англ. *clusters of differentiation* — кластеры дифференциации). В настоящее время известно более 200 CD-антигенов. Эти антигены выполняют функцию специфических маркеров, по которым можно определить направление развития, степень зрелости клеток, их популяцию и субпопуляцию, стадию дифференциации и активации.

1.1.1. Свойства антигенов

Основные свойства, характеризующие вещество как антиген, таковы: антигенность, специфичность, иммуногенность.

Антигенность — это способность антигена специфически взаимодействовать с факторами иммунитета (антителами, клонами эффекторных лимфоцитов). Любые вещества, являющиеся генетически чужеродными, распознаются иммунной системой, то есть обладают антигенностью. Полноценные антигены обладают и антигенностью, и иммуногенностью. Гаптены распознаются иммунной системой при связывании с В-клеточными рецепторами лимфоцитов, но дальнейшего развития иммунного ответа не происходит, так как данные субстанции не являются иммуногенами. Тем не менее гаптены способны взаимодействовать с готовыми антителами, выработанными против них, при иммунизации животного конъюгатом гаптен — носитель (рис. 1.1).

Специфичность — это способность антигена взаимодействовать со строго определенными антителами или антигенными рецепторами лимфоцитов. Иммунологическая специфичность антигенов определяется не всей макромолекулой антигена в целом, а структурой антигенных детерминант (аминокислотным составом и последовательностью аминокислот, характером, положением, стереоизомерией химических группировок в детерминанте, вторичной и третичной структурой детерминанты). Иммунологической специфичностью обладают и гаптены, которые специфически взаимодействуют с готовыми антителами.

Замены одной-двух аминокислот в составе полипептидной цепи молекулы белка или концевых аминокислот часто достаточно для того, чтобы молекулы

различались в антигенном отношении. Антигенная специфичность белка зависит и от его вторичной и третичной структуры.

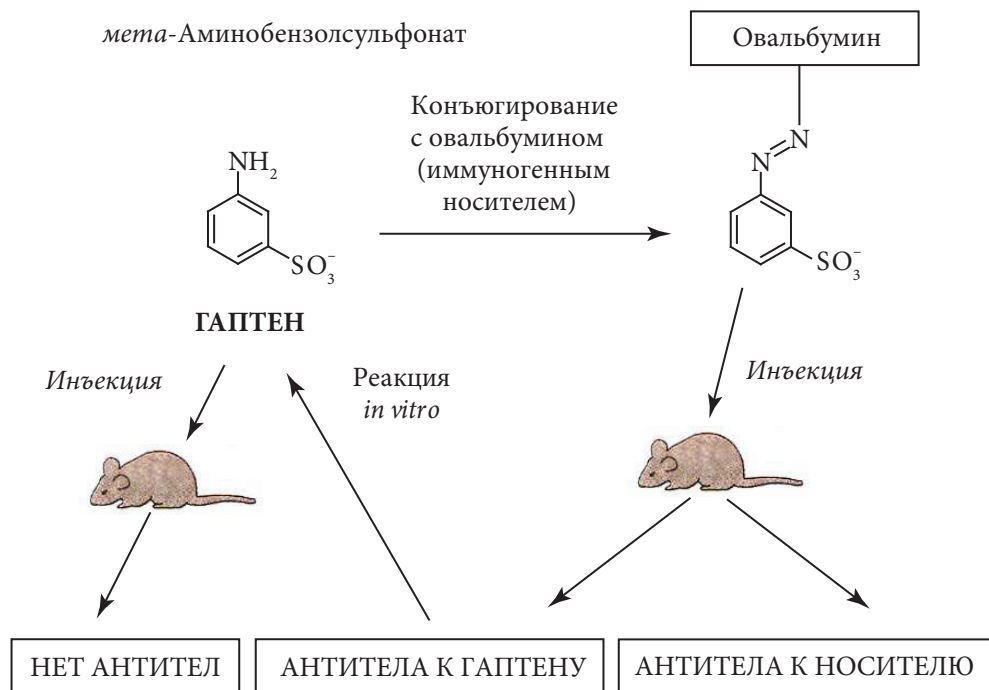


Рис. 1.1. Свойства гаптена

Эпитопы, которые распознаются антигенными рецепторами В- и Т-лимфоцитов, имеют свои особенности.

В-клеточные эпитопы называют эпитопами конформационного типа. Они образованы аминокислотными остатками, которые входят в состав различных участков белковой молекулы, но оказываются сближенными в пространственной конфигурации белковой глобулы. Находятся В-клеточные эпитопы на внешней поверхности антигена, образуя петли и выступы. Обычно число аминокислот или сахаров в эпитопе составляет от 6 до 8. Антигенраспознающие рецепторы В-клеток распознают нативную (пространственную) конформацию эпитопа, а не линейную последовательность аминокислотных остатков.

Т-клеточные эпитопы представляют собой линейную последовательность аминокислотных остатков, составляющих часть антигена, и включают большее число аминокислотных остатков по сравнению с В-клеточными эпитопами. Для распознавания Т-клеточных эпитопов сохранения пространственной конфигурации не требуется.

Иммуногенность — это способность антигена вызывать иммунную защиту макроорганизма. Зависит иммуногенность от таких факторов, как

чужеродность, природа антигена, его молекулярная масса, растворимость и химическое строение. Помимо свойств молекул на иммуногенность влияют и пути и режимы их введения в организм.

Чужеродность. Условие чужеродности антигена связано с основной функцией иммунной системы, состоящей в защите организма от биологической агрессии. Для того чтобы вещество выступило в качестве иммуногена, оно должно быть распознано как «не свое». Чем более чужероден антиген, то есть чем менее он сходен с собственными структурами организма, тем более сильный иммунный ответ он вызывает. Поскольку чужеродность проявляется относительно конкретного организма, молекула, воспринимаемая как антиген одним организмом, может не восприниматься в качестве антигена другим.

Иммуногенность возрастает по мере увеличения «эволюционного расстояния» между донором и реципиентом. Например, синтез антител к бычьему сывороточному альбумину легче вызвать у кролика, чем у козы. Кролики относятся к отряду зайцеобразных и в филогенетическом развитии отстают дальше от козы и быка, принадлежащих к парнокопытным.

Вместе с тем неродственное происхождение веществ не является абсолютным критерием иммуногенности, что объясняется эволюционной консервативностью протеинов. Так, свиной, бычий и лошадиный инсулин мало отличается по составу от инсулина человека и при парентеральном введении больным сахарным диабетом не может вызвать сильной иммунной реакции.

Это свойство используется при оценке степени иммуногенности гомологичных белков. Чем больше различия в первичной структуре белков, тем выше иммуногенность (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Различия в аминокислотных последовательностях гемоглобина человека и других млекопитающих

Пара видов	Различия	
	α-цепь	β-цепь
Человек — шимпанзе	0	0
Человек — горилла	1	1
Человек — макака-резус	3	5
Человек — мышь	13–15	18
Человек — кролик	18	10
Человек — собака	16–17	10
Человек — лошадь	13	17
Человек — свинья	13	16
Человек — коза	14–16	18–20

Природа антигена. Наиболее сильными иммуногенами являются белки. Чистые полисахариды, нуклеиновые кислоты и липиды обладают слабыми иммуногенными свойствами. В то же время липополисахариды, гликопротеины, липопротеины способны в достаточной мере активировать иммунную систему.

Молекулярная масса. Важнейшим фактором, определяющим иммуногенность антигенов, является размер молекулы. При прочих равных условиях большая молекулярная масса антигена обеспечивает бóльшую иммуногенность. Антигены считаются хорошими иммуногенами, если их молекулярная масса больше 10 кДа. Чем больше молекулярная масса, тем больше мест связывания (эпитопов), что приводит к возрастанию интенсивности иммунного ответа (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Взаимосвязь между молекулярной массой антигена и иммуногенностью

Антиген	Молекулярная масса, Да	Число эпитопов	Иммуногенность
Сывороточный альбумин лошади	69 000	3	Слабая
γ-Глобулин человека	100 000	7	Выраженная
Вирус табачной мозаики	40 000 000	650	Сильная

Помимо количества эпитопов, облегчающих распознавание антигена и развитие иммунной реакции, размером молекулы определяются и особенности структуры антигена. Для белков пороговый размер молекулы, обуславливающий появление иммуногенности, ниже, чем для углеводов. Предполагают, что эта граница связана с появлением α-спиральной структуры. Для углеводов высокая иммуногенность фиксируется при молекулярной массе в десятки тысяч.

Растворимость. Корпускулярные антигены, связанные с клетками (эритроциты, бактерии), как правило, более иммуногенны. Растворимые антигены (сывороточный альбумин) тоже могут обладать высокой иммуногенностью, но они быстрее выводятся. Увеличить время их пребывания в организме, необходимое для развития эффективного иммунного ответа, позволяют адъюванты (депонирующие вещества); это неспецифические стимуляторы иммуногенеза неорганической и органической природы (от лат. *adjuvans* — помогающий, поддерживающий). Из неорганических адъювантов широко применяются гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия и др. Из органических — ланолин, адъювант Фрейнда. Адъюванты используются как стимуляторы выработки антител, иммунных реакций при введении антигенов в организм человека и животных.

Многие адъюванты при парентеральном введении вызывают в тканях формирование воспалительных гранулем. Местная воспалительная реакция повышает активность макрофагов в области введения антигена. Образование гранулемы предотвращает быстрое удаление антигена, поэтому он может долгое время воздействовать на иммунную систему. Указанное выше и определяет стимулирующее воздействие адъювантов на иммуногенез. Иммунологические адъюванты используются для приготовления высокоактивных иммунных сывороток от животных.

Химическое строение антигена. Для проявления иммуногенности огромное значение имеет химическая структура антигена. Например, пептиды, полученные на основе одной аминокислоты, несмотря на их высокую молекулярную массу, иммуногенности не проявляют. Сополимеры, включающие две или три аминокислоты, способны вызвать иммунный ответ.

Увеличение числа ароматических аминокислот в синтетических полипептидах повышает их иммуногенность. При равной молекулярной массе (около 70 000 Да) альбумин является более сильным антигеном, чем гемоглобин. В то же время белок коллаген, молекулярная масса которого в 5 раз больше, чем у альбумина (330 000 Да), обладает значительно меньшей иммуногенностью по сравнению с альбумином, что, несомненно, связано с особенностями строения этих белков.

Наличие ароматических аминокислот наряду с другими аминокислотами, несущими заряд, стабилизирует конформацию белка, что очень важно для его взаимодействия с В-клеточным рецептором (BCR), который распознает эпитопы нативной структуры белка.

Т-клеточные рецепторы (TCR) распознают антигены после их внутриклеточного расщепления (процессинга) в комплексе с белками МНС — главного комплекса гистосовместимости (от англ. *major histocompatibility complex*). Если антиген не способен расщепляться внутриклеточными протеазами, иммунный ответ или не развивается, или выражен слабо. Это имеет место, например, при введении белков, построенных из D-аминокислот, отсутствующих у позвоночных.

Доза антигена и пути его введения в организм. Для развития достаточно сильного иммунного ответа требуется определенная доза антигена. Малые и большие дозы антигена вызывают низкий уровень иммунного ответа; высокий уровень формируется при введении некоторой промежуточной (оптимальной) дозы. Для каждого антигена и животного существует своя оптимальная доза, которая дает максимально выраженный иммунный ответ.

Выраженность иммунного ответа зависит также от пути поступления антигена в организм. Попадание антигена через желудочно-кишечный тракт

или дыхательные пути нередко приводит к развитию иммунологической толерантности.

Проникновение антигена в ткани, как правило, сопровождается их повреждением и развитием воспалительной реакции (простейший пример — заноза). Характер повреждения и выраженность иммунной реакции зависят от вида ткани в силу различной заселенности видов последней иммунокомпетентными клетками.

Поступление антигена в кровоток обычно обходится без воспаления, при этом антиген задерживается либо в лимфатических узлах, либо в селезенке или печени.

1.1.2. Антигены бактериальной клетки

Бактериальная клетка представляет собой сложный комплекс антигенов. Среди бактериальных антигенов различают структурные, непосредственно связанные с клеткой, и секретируемые во внешнюю среду.

Структурные антигены бактерий по локализации подразделяют на жгутиковые, соматические и капсульные (рис. 1.2).

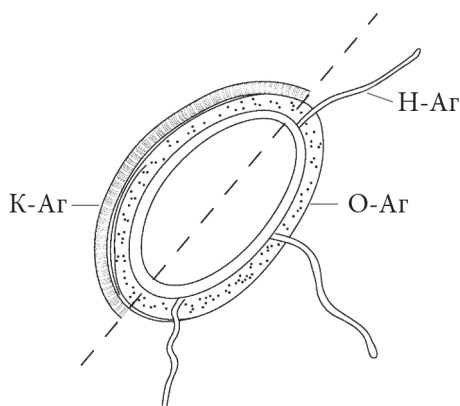


Рис. 1.2. Антигены бактерий

(приведено по: Красочко П. А. Иммунология. Минск : Аверсэв, 2005. С. 73)

Жгутиковые антигены (Н-антигены) имеются у всех подвижных бактерий. Они представляют собой эпитопы сократительного белка флагеллина. При нагревании до 56–80 °С флагеллин денатурирует, и Н-антиген теряет свою специфичность. Фенол на этот антиген не действует.

Соматические антигены (О-антигены) связаны с клеточной стенкой бактерий. Ранее полагали, что О-антиген заключен в содержимом клетки, ее соме, поэтому его и называли соматическим антигеном. Впоследствии выяснилось, что этот антиген связан с клеточной стенкой бактерий. У грамотрицательных бактерий О-антиген — это сложный комплекс липидополиса-

харидно-белковой природы. Он высокотоксичен и является эндотоксином грамотрицательных бактерий. Детерминантными группами этого сложного комплексного антигена выступают концевые повторяющиеся звенья полисахаридных цепей. У грамположительных бактерий основной соматический антиген — тейхоевые кислоты.

О-антиген термостабилен, не разрушается при кипячении в течение 1–2 ч, однако подвержен действию альдегидов (например, формалина). Соматические антигены обладают хорошо выраженной иммуногенной способностью.

Капсульные антигены (К-антигены) содержатся в капсуле бактерий и отличаются от антигенов клетки. К-антигены располагаются более поверхностно, чем О-антигены, и часто маскируют их, поэтому для выявления О-антигена нужно кипячением разрушить К-антиген.

Как правило, капсульные антигены состоят из кислых полисахаридов (уроновых кислот). У сибиреязвенных бактерий капсульный антиген состоит из полипептидов.

По чувствительности к нагреванию различают три типа капсульных антигенов: А, В и L. Наибольшая термостабильность характерна для К-антигенов типа А, они не денатурируют даже при длительном кипячении. К-антигены типа В выдерживают непродолжительное нагревание (около 1 ч) до 60 °С. К-антигены типа L при этой температуре быстро разрушаются.

Вариантом капсульного антигена является поверхностный полисахаридный антиген, присутствующий на поверхности энтеробактерий, обладающих высокой вирулентностью. Он получил название антигена вирулентности, или Vi-антигена. Обнаружение этого антигена или специфичных к нему антител имеет большое диагностическое значение.

К **секретируемым (растворимым) бактериальным антигенам** относятся экзотоксины и экзоферменты, в том числе ферменты агрессии (гиалуронидаза, фибринолизин и др.).

Столбнячный, дифтерийный и ботулинический токсины относятся к числу сильных полноценных антигенов, поэтому их используют для получения анатоксинов для вакцинации людей. При взаимодействии со специфическими антителами токсины, ферменты и другие биологически активные молекулы бактериального происхождения теряют свою активность.

В антигенном составе некоторых бактерий выделяется группа антигенов с сильно выраженной иммуногенностью, чья биологическая активность играет ключевую роль в формировании патогенности возбудителя. Связывание таких антигенов специфическими антителами практически полностью инактивирует вирулентные свойства микроорганизма и обеспечивает иммунитет к нему. Эти антигены получили название **протективных**. Очищенные протективные антигены могут быть «идеальными» вакцинными препаратами.

1.1.3. Антигены вирусов

Каждый вирус представляет собой сложную смесь антигенов, определяемую в первую очередь структурными белками. Вирусные белки неравнозначны по своей антигенной активности. Гликопротеины поверхности оболочечных вирусов и капсидные белки безоболочечных вирусов являются главными протективными антигенами (рис. 1.3).

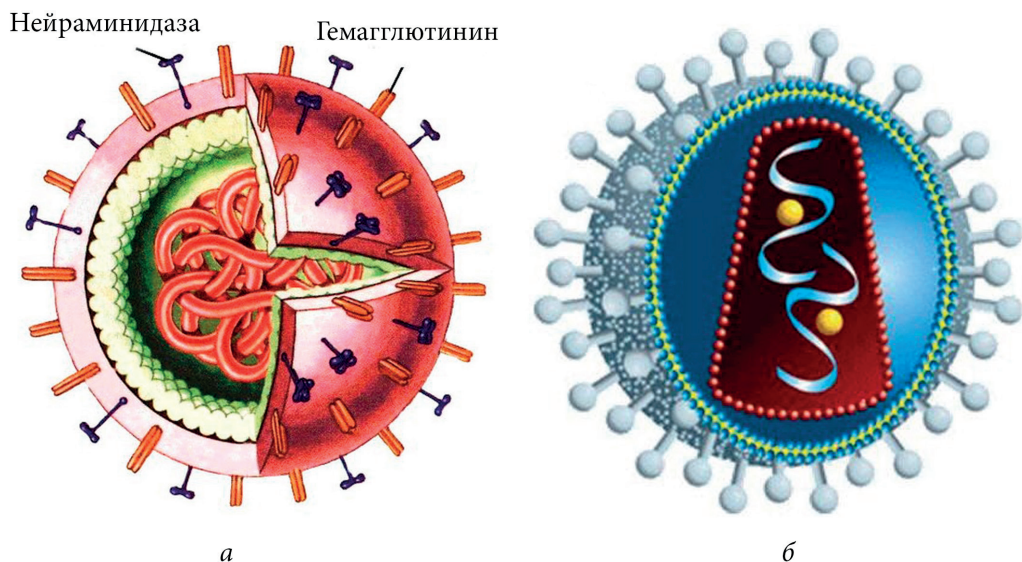


Рис. 1.3. Структура вируса гриппа (а) и вируса иммунодефицита человека (б)

Антигены простых вирионов связаны с их нуклеокапсидами. По своему химическому составу они принадлежат к рибонуклеопротеидам или дезоксирибонуклеопротеидам, которые являются растворимыми соединениями и поэтому обозначаются как S-антигены (от лат. *solutio* — раствор). У сложноорганизованных вирионов одни антигенные компоненты связаны с нуклеокапсидами, а другие — с гликопротеинами внешней оболочки. Многие простые и сложные вирионы содержат особые поверхностные V-антигены — гемагглютинин и фермент нейраминидазу (см. рис. 1.3, а).

Некоторые инфекционные агенты (в частности, вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека) обладают способностью изменять свою антигенность. Изменение антигенной структуры, вызванное точечными мутациями в гене, контролирующем образование вируса, называется антигенным дрейфом. Одной из проблем у создателей вакцины против ВИЧ является сильная изменчивость вируса — его выраженный антигенный дрейф.

Резкое изменение антигенности, в основе которой лежит рекомбинация между двумя генами, называется антигенным шифтом. Так, у вируса гриппа имеются суперкапсидные антигены — гликопротеины гемагглютинин и ней-

раминидаза. Вследствие генетических рекомбинаций возникает новый штамм вируса с новым типом гемагглютинина (антигенный шифт), к которому у людей еще нет иммунитета, и этот новый штамм вызывает новую пандемию.

1.1.4. Антигены организма человека

Изучение антигенных свойств тканей человека было начато после открытия К. Ландштейнером в 1901 г. групповых антигенов эритроцитов (система АВ0). На сегодняшний день известно более 250 различных эритроцитарных антигенов. Наиболее важное клиническое значение имеют антигены системы АВ0 и *Rh* (резус-фактор) при переливаниях крови, пересадке органов и тканей, для предупреждения и лечения осложнений беременности.

Антигены системы АВ0. Система АВ0 основана на существовании естественных антител (агглютининов) против антигенов, находящихся на поверхности чужеродных эритроцитов. Антигены системы АВ0 определяют наличие в человеческой популяции носителей четырех групп крови: 0 (I), А (II), В (III) и АВ (IV). У носителей группы крови А на поверхности эритроцитов находятся олигосахаридные антигены с концевым N-ацетилгалактозамином. Характеристичный антиген крови группы крови В отличается от антигена крови группы А только заменой концевого остатка олигосахарида на галактозу. Носители группы крови АВ имеют оба антигена — А и В, а у носителей группы крови 0 олигосахарид укорочен на этот концевой остаток сахара (табл. 1.3). Причиной групповых различий крови являются незначительные мутации в ферментах, которые переносят концевой остаток сахара на характеристичный олигосахарид гликопротеина мембраны эритроцита.

Таблица 1.3

Антигены системы АВ0

Антиген (агглютиноген)	Антитела (агглютинины)	Группа крови	Частота встречаемости у европеоидов, %
0 (олигосахарид недостроен)	Анти-А, анти-В	0 (I)	40
А (N-ацетил- <i>D</i> -галактозамин)	Анти-В	А (II)	44
В (<i>D</i> -галактоза)	Анти-А	В (III)	12
АВ (N-ацетил- <i>D</i> -галактозамин, <i>D</i> -галактоза)	Отсутствуют	АВ (IV)	4

В крови группы А присутствуют антитела против антигена В. В крови группы В имеются антитела против антигена А. В крови группы 0 (антиген Н) име-

ются антитела против антигенов А и В. В крови крови группы АВ нет никаких антител против группоспецифичных антигенов.

Группа крови у человека постоянна, она не изменяется в течение жизни и передается по наследству. Группы крови имеются не только у человека, но и почти у всех теплокровных животных. Кровь животных независимо от ее групповой принадлежности с кровью человека несовместима.

При переливании крови надо учитывать совместимость ее групп. Основное правило переливания крови таково: *среда реципиента должна быть пригодна для жизни эритроцитов донора*. В результате переливания крови эритроциты донора не должны склеиваться (агглютинировать) при взаимодействии с антителами крови реципиента. Агглютинация сопровождается разрушением (гемолизом) эритроцитов и выходом в плазму крови гемоглобина и красящих пигментов, что может вызвать тяжелую реакцию в организме реципиента (прежде всего — со стороны почек).

Обычно реципиенту переливают значительно меньше крови, чем у него имеется в организме. Вводимая кровь сильно разбавляется кровью реципиента, концентрация вводимых антител (агглютининов) оказывается малой, и она не может вызвать агглютинацию эритроцитов. При небольших количествах переливаемой крови лица с 0 (I) группой крови считаются универсальными донорами, лица с кровью группы АВ (IV) — универсальными реципиентами (рис. 1.4).

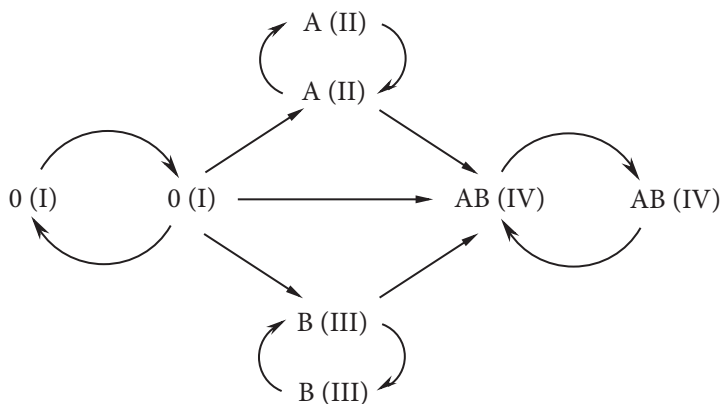


Рис. 1.4. Допустимые варианты переливания крови

В настоящее время представление об универсальном доноре и универсальном реципиенте имеет чисто историческую ценность, разрешено переливать только одногруппную кровь.

Антигены системы резус. Кроме агглютиногенов А и В на поверхности эритроцитов крови большинства людей может содержаться антиген, полу-

чивший название *резус-фактор* (*Rh*-фактор). Резус-антиген по химической природе — липопроtein. Впервые он был обнаружен в крови обезьян макак-резус. Резус-фактор выявляется в крови 85 % людей европеоидной расы и у 99 % монголоидов, их кровь — резус-положительна (*Rh*+). Кровь, в которой резус-антиген отсутствует, называется резус-отрицательной (*Rh*-). *Rh*-фактор равномерно распределен во всех группах крови и учитывается при ее переливании и вынашивании беременности.

Если у резус-отрицательной беременной плод резус-положительный, то эритроциты плода могут во время родов попасть в кровоток матери и вызвать образование антител (тип IgG, плацентарный) против резус-антигена. При повторной беременности резус-положительным плодом антирезусные антитела матери могут проходить через плаценту в кровоток плода, связываться с резус-антигенами его эритроцитов и разрушать их. Для предотвращения резус-конфликта в течение 72 ч после первых родов в кровь матери вводят готовые антирезусные антитела, которые лизируют (разрушают) попавшие в ее организм эритроциты плода, и иммунизации организма матери с последующим образованием собственных антител не происходит.

Антигены тканевой совместимости (гистосовместимости). На лейкоцитах (лимфоцитах) крови выявлены лейкоцитарные антигены, которые получили название HLA (от англ. *human leucocyte antigens* — человеческие лейкоцитарные антигены). Наборы HLA у каждого человека индивидуальны, что обуславливает несовместимость тканей при пересадках между индивидуумами. В настоящее время более общепринятое название — антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антигены МНС подразделяются на два класса: МНС-I и МНС-II (в порядке открытия), различающиеся строением. На сегодня известно, что эти антигены находятся на мембранах не только лейкоцитов, но и клеток других тканей организма.

Антигены МНС распределены среди клеток разных типов неодинаково. Молекулы МНС класса I экспрессируют большинство ядерных (содержащих ядро) клеток, тогда как экспрессия молекул МНС класса II ограничена антигенпрезентирующими клетками (дендритными клетками и активированными макрофагами) и В-лимфоцитами. У человека молекулы МНС класса II обнаруживаются также на клетках эпителия, нейронах, клетках эндокринных желез и на Т-клетках.

Молекулы МНС являются по химической природе гликопротеинами и имеют сложную пространственную организацию (рис. 1.5).

Молекула МНС класса I состоит из одной гликозилированной тяжелой цепи (45 кДа), нековалентно связанной с полипептидом — β_2 -микроглобулином (12 кДа).

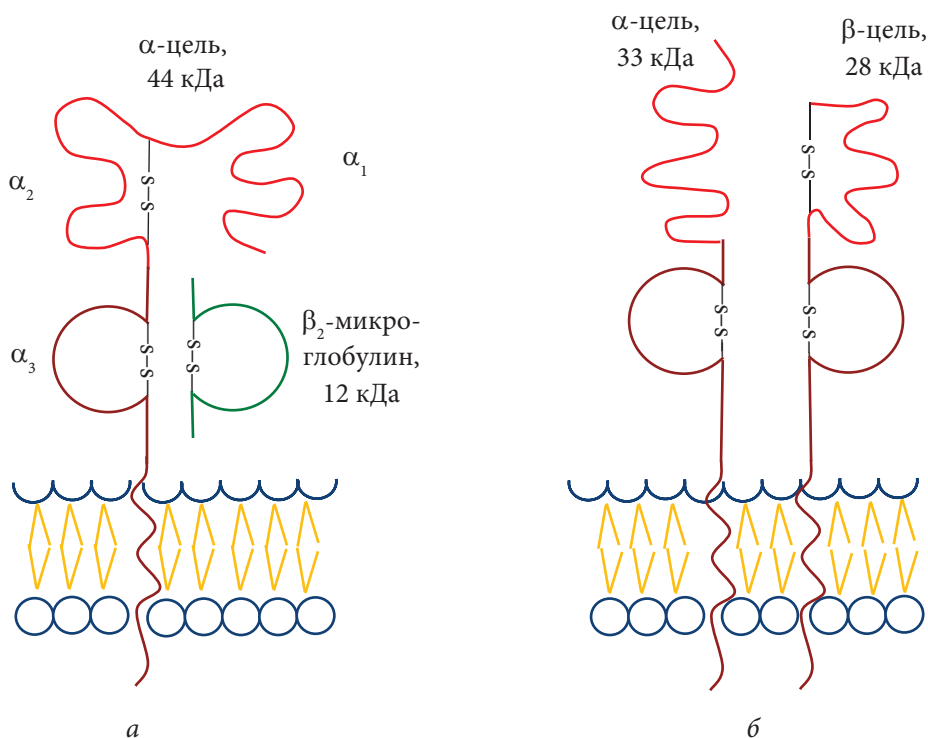


Рис. 1.5. Строение антигенов МНС (греческими буквами обозначены домены, черными кружками отмечена локализация углеводных фрагментов):
 а — молекулы МНС класса I; б — молекулы МНС класса II

Молекулы МНС класса II — гетеродимерные гликопротеины, состоящие из тяжелой (α , 30–34 кДа) и легкой (β , 26–29 кДа) полипептидных цепей. По общему строению молекулы МНС класса II подобны молекулам МНС класса I при одном существенном отличии: антигенсвязывающая полость сформирована у них не двумя доменами одной α -цепи, как у молекул класса I, а двумя доменами разных цепей $\alpha\beta$ -гетеродимера.

Укладка полипептидных цепей молекул МНС обеспечивает образование антигенсвязывающей полости, в которой связываются пептидные фрагменты расщепленного (процессированного) антигена для их презентации Т-клеткам. При этом молекулы класса I способны связывать пептиды, состоящие из 8–9 аминокислотных остатков, молекулы класса II — несколько более длинные пептиды.

Основная функция молекул МНС состоит в презентации (представлении в удобной для распознавания форме) антигенов. При этом роли у молекул класса I и молекул класса II разные:

- молекулы МНС класса I образуют комплекс с синтезируемыми в клетке фрагментами эндогенных клеточных антигенов и выносят их на поверхность клетки (презентируют);
- молекулы МНС класса II образуют комплекс с фрагментами экзогенных клеточных антигенов, расщепляемых в фаголизосомах, и презентуют их на клеточной поверхности.

1.1.5. Антигенные диагностикумы

С целью серодиагностики (обнаружения антител в сыворотке крови) используются антигенные диагностикумы (бактериальные, вирусные и эритроцитарные). Они представляют собой препараты, содержащие взвесь обезвреженных микроорганизмов или выделенные из них определенные антигены.

Для получения диагностикумов используют штаммы микроорганизмов с высокой чувствительностью к антителам и способностью длительное время сохранять антигенные свойства. Производство диагностикумов требует тщательной подготовки и селекции штаммов микроорганизмов, которые для этого используются. Производственные штаммы должны находиться в S-форме. Это обеспечивает им хорошую агглютинабельность, специфичность и образование устойчивой гомогенной взвеси. Определенные штаммы микроорганизмов выращивают для получения диагностикумов на агаровых средах.

Корпускулярные антигены представляют собой взвесь убитых (реже — живых) микробов в физиологическом растворе с определенной концентрацией консерванта. Корпускулярные риккетсиозные, вирусные антигены-диагностикумы готовят из тканей зараженных животных, желтков зараженных куриных эмбрионов или из культур клеток. Во всех случаях антигены должны быть высокой степени очистки. Такие материалы предварительно подвергают обработке эфиром и дифференциальному центрифугированию для максимального освобождения от тканевых элементов. Очищенную взвесь риккетсий или вирусов консервируют 0,25–0,5 % раствором фенола или 0,2 % раствором формалина.

Корпускулярные антигены используются для постановки реакций агглютинации и реакции связывания комплемента (РСК).

Растворимые антигены готовят в виде экстрактов из агаровых культур соответствующих микробов. Они используются для постановки серологического диагноза с применением РСК, а также при постановке реакции иммунодиффузии.

Бактериальные диагностикумы могут содержать инаktivированную микробную взвесь или отдельные антигенные компоненты бактерий (О-, Н- или Vi-антигены) и используются в реакциях агглютинации.

Приготовление жгутикового Н-антигена основано на том, что обработка подвижных микробов формалином приводит к понижению активности сома-

тического антигена. Для приготовления Н-антигена к взвеси агаровой культуры микробов в физиологическом растворе добавляют 0,2 % формалина, после чего взвесь выдерживают 24 ч в термостате при 37 °С.

В основу приготовления О-антигена положено различие в устойчивости О- и Н-антигенов к нагреванию. Самым простым способом приготовления О-антигена является прогревание пробирки со смывом агаровой культуры соответствующего микроорганизма в кипящей водяной бане в течение 1,5–2 ч.

Наиболее трудно приготовить Vi-антиген, так как он обладает малой устойчивостью к различным воздействиям, в том числе и к воздействию формалина. Готовится Vi-антиген из поверхностных компонентов микробных клеток, консервируется формалином, но перед формалинизацией его стабилизируют 25 % раствором хлорида кальция.

При изготовлении бактериальных антигенов используют живые культуры или гомогенные стандартизированные взвеси убитых микробов. Антигены из живых культур применяются редко, что связано с технологическими трудностями и возможностью заражения лабораторного персонала. Диагностикумы из убитых культур являются предпочтительными.

Вирусные диагностикумы — это препараты, содержащие инаktivированные вируссодержащие жидкости (культуральные, из куриных эмбрионов или организма животных, зараженных соответствующим вирусом); применяются в реакции связывания комплемента, реакции торможения гемагглютинации и реакции нейтрализации.

Эритроцитарные диагностикумы представляют собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами, извлеченными из бактерий, и применяются в реакции пассивной гемагглютинации. Для приготовления эритроцитарных диагностикумов чаще всего используют эритроциты барана (они обладают высокой адсорбирующей активностью), но можно взять эритроциты и других животных (лошади, кролика, курицы, мыши). Адсорбционная емкость эритроцитов увеличивается при обработке их растворами танина или хлорида хрома.

Кровь для получения эритроцитов берут стерильно, эритроциты несколько раз отмывают стерильным фосфатным буфером, центрифугируют, консервируют формалином и ресуспендируют в фосфатно-буферном растворе. Затем их сенсибилизируют антигеном. Сенсибилизированные эритроциты разводят фосфатным буфером с формальдегидом до 10 % концентрации, расфасовывают во флаконы и сдают на контроль. Эритроцитарный диагностикум контролируют на активность, специфичность, стерильность, концентрацию эритроцитов и рН.

1.2. Антитела

А н т и т е л а — это сложные белки (гликопротеины), способные к специфическому связыванию с антигенными детерминантами антигенов.

Впервые основное свойство антител — способность связываться с молекулами антигенов — было обнаружено в 1890 г. немецким врачом Эмилем фон Берингом совместно с Шибасабуро Китагато. Они сначала в эксперименте на животных, а затем и на людях показали, что после перенесенной дифтерии или столбняка в крови образуются вещества, которые обеспечивают иммунитет к этим болезням как самим переболевшим, так и тем, кому такая кровь будет перелита. Эти вещества были названы антитоксинами. В 1901 г. Эмилю фон Берингу была присуждена первая Нобелевская премия по физиологии и медицине. В дальнейшем П. Эрлих термин «антитоксин» заменил термином более широким — «антитело».

Строение антител было установлено Р. Портером и Дж. Эдельманом. В 1958 г. профессор Оксфордского университета Родней Портер выделил Fab- и Fc-фрагменты и установил принципиальное строение антител. Американский врач и биохимик Джеральд Эдельман в 1959 г. выделил тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов и определил их аминокислотную последовательность. Определение структуры иммуноглобулинов — важнейшее достижение иммунохимии. За эти исследования Р. Портеру и Дж. Эдельману в 1972 г. была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

Антитела имеют глобулярное строение и при электрофорезе сывороточных белков обнаруживаются в γ -глобулиновой фракции. Поскольку эти белки имеют иммунное происхождение (синтезируются В-клеточной линией), в конце 50-х годов прошлого века для них было введено общее название — иммуноглобулины (Ig).

По пространственной структуре антитела представляют собой семейство Y-образных гликопротеинов, у которых обе вершины могут связывать антиген. Несмотря на видимое разнообразие, все мономеры иммуноглобулинов разных классов имеют универсальное строение.

1.2.1. Строение антител

Основная структурная единица иммуноглобулинов (протомер) состоит из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей. Легкие цепи (L, от англ. *light*) имеют молекулярную массу 25 кДа, тяжелые (H, от англ. *heavy*) — молекулярную массу 50–77 кДа. Полипептидные цепи удерживаются вместе ковалентными и нековалентными связями. К ковалентным относятся дисульфидные связи, образующие мостики между тяжелыми цепями, между цепями тяжелыми и легкими, а также внутри цепей. К H-цепям присоединены олигосахаридные

фрагменты, которые составляют от 3 до 12 % от общей массы иммуноглобулинов.

Как у H-, так и у L-цепей выделяют две области: константную (C_H и C_L соответственно), в которой постоянная последовательность аминокислот, и переменную (V_H и V_L), характеризующуюся изменчивостью аминокислотной последовательности. Основные различия между переменными областями антител разной специфичности находятся в так называемых гиперпеременных участках; их по три и в тяжелых, и в легких цепях. Гиперпеременные участки формируют активные центры антител. Они получили название CDR (от англ. *complementarity determining region* — участки, обеспечивающие комплементарность антитела к антигену). Другие сегменты V-области называются каркасными, на их долю приходится ~80 %. Каркасные сегменты обеспечивают пространственную ориентацию и сближение CDR при формировании антиген-связывающих центров (рис. 1.6).

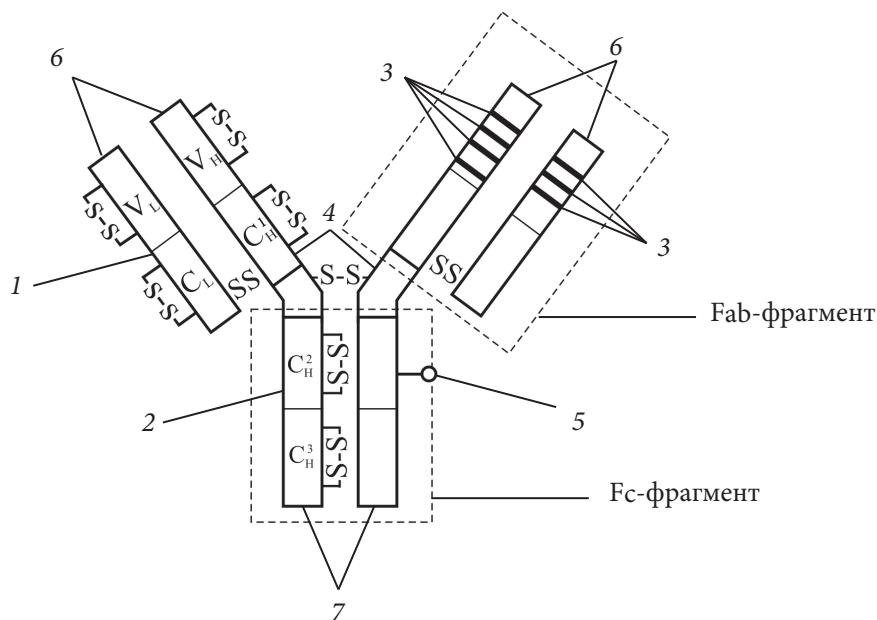


Рис. 1.6. Схема строения мономера иммуноглобулина:

I — легкая цепь; 2 — тяжелая цепь; 3 — гипервариабельные участки; 4 — шарнирная область; 5 — остаток олигосахарида; 6 — N-концы; 7 — C-концы; V_L и V_H — вариабельные области легкой и тяжелой цепей соответственно; C_H^1 , C_H^2 и C_H^3 — константные (постоянные) области тяжелой цепи; C_L — константные области легкой цепи; пунктиром обведены Fab- и Fc-фрагменты

Цепи иммуноглобулинов свернуты в несколько глобулярных структур — доменов, которые удерживаются за счет внутрицепочечных дисульфидных связей. Легкие цепи образуют два домена (константный и вариабельный), тя-

желые — четыре или пять (в зависимости от класса иммуноглобулина), один из которых — вариабельный (рис. 1.7).

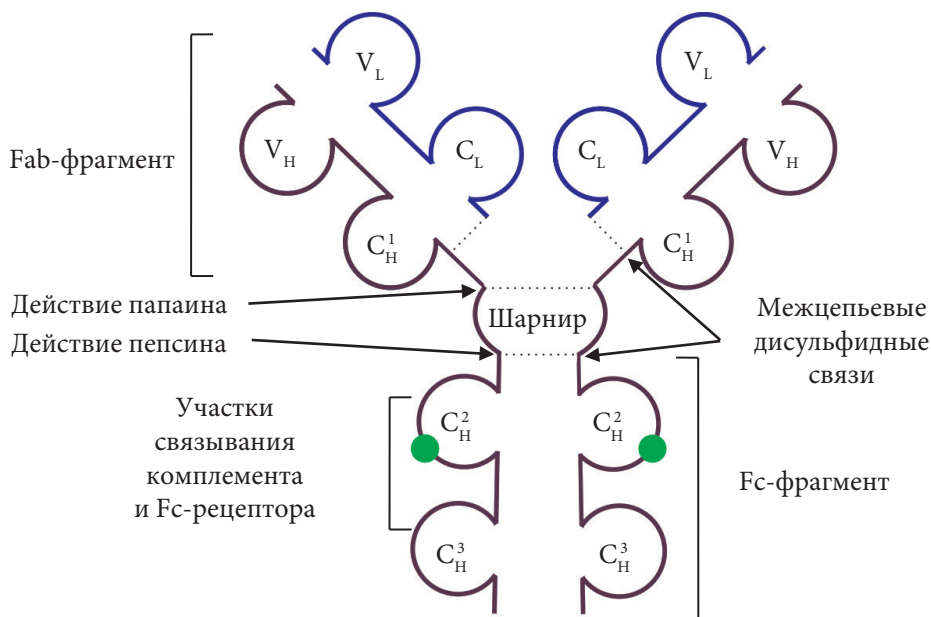


Рис. 1.7. Доменная структура молекулы иммуноглобулина

Домены принято нумеровать в направлении от N-конца к С-концу. Аминокислотные последовательности доменов легкой и тяжелой цепей, расположенных напротив друг друга, являются гомологичными.

Положение внутрицепочечных дисульфидных связей, обособляющих домены, относительно постоянно для каждого класса иммуноглобулинов. Расположение межцепочечных связей $-S-S-$ индивидуально для разных классов и подклассов антител.

Фрагмент тяжелой цепи между доменами C_H^1 и C_H^2 называют шарнирной областью. Шарнирная область — особая часть полипептидной цепи, не входящая в состав домена. Это наиболее лабильная, гибкая часть молекулы в силу большого числа остатков пролина, что позволяет активным центрам функционировать независимо один от другого при взаимодействии с антигенами. В домене C_H^2 локализуются сайты гликозилирования (их количество в иммуноглобулинах разных изоформ разное). В доменах C_H^2 и C_H^3 находятся участки, обладающие сродством к компоненту $C1q$ -комплемента и к Fc-рецепторам. За исключением домена C_H^2 домены тяжелой цепи тесно прилегают к гомологичным доменам (V и C) легкой цепи и к C_H^3 области другой тяжелой цепи.

Незащищенный шарнирный участок имеет протяженную структуру и доступен для протеолитических ферментов, которые атакуют молекулу иммуно-

глобулина выше или ниже шарнирной области. С их помощью можно получать фрагменты иммуноглобулинов для исследовательских либо медицинских целей.

Под действием фермента папаина мономер иммуноглобулина расщепляется на два одинаковых Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент (рис. 1.8).

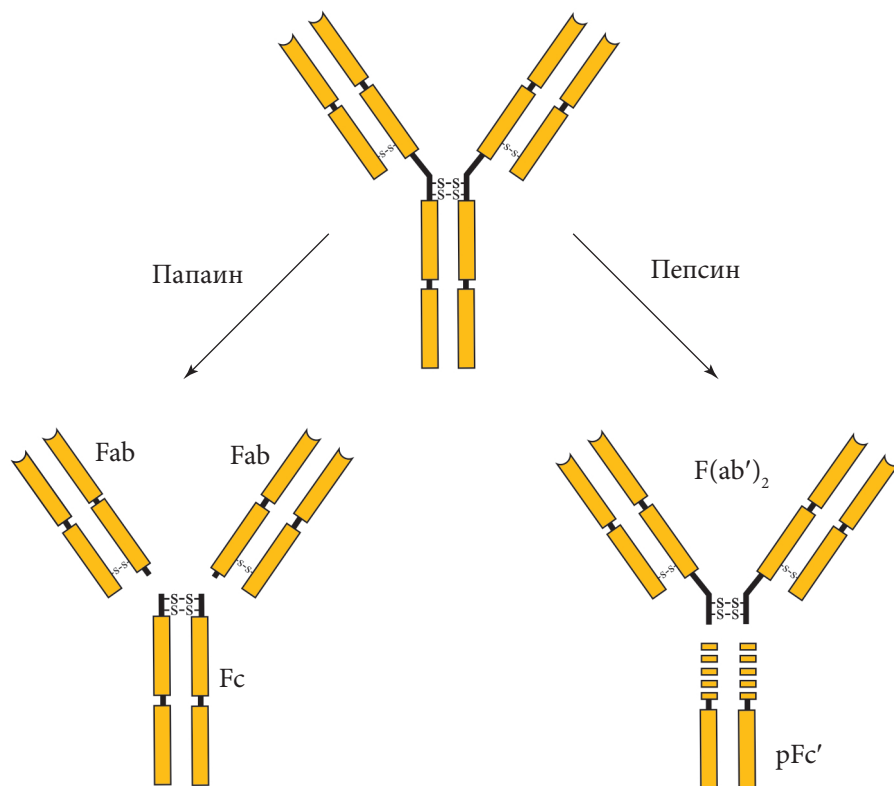


Рис. 1.8. Схема протеолитического расщепления иммуноглобулина

В состав Fab-фрагмента (молекулярная масса 45 кДа) входит вся легкая цепь и N-концевая половина тяжелой цепи, включающая V- и C_H¹-домены. Присутствие в них V-доменов H- и L-цепей обеспечивает сохранность структуры активного центра и способность специфически связывать антиген, отсюда и название (от англ. *fragment antigen binding*).

Fc-фрагмент (от англ. *fragment crystallizable*) имеет молекулярную массу 50 кДа и состоит лишь из отрезков константных областей тяжелых цепей. Он не может связывать антиген, но определяет так называемые эффекторные функции антител. К ним относятся способность иммуноглобулинов присоединяться к клеткам за счет взаимодействия с клеточными рецепторами, а также связывание с первым компонентом (C1q) комплемента при активации этой системы по классическому пути.

Другой протеолитический фермент — пепсин — расщепляет молекулу ниже дисульфидных связей, скрепляющих H-цепи. При его действии образуются двухвалентный $F(ab')_2$ -фрагмент с молекулярной массой более 90 кДа и несколько осколков Fc-фрагмента, из которых наиболее крупный назван $\rho Fc'$ -фрагментом.

Легкие и тяжелые цепи, объединенные дисульфидными связями, можно разделить, восстанавливая связи S-S (например, меркаптоэтанолом в подкисленной среде).

Тяжелые цепи по различиям первичной структуры C-областей делятся на пять типов: γ , μ , α , ϵ и δ (гамма, мю, альфа, эpsilon и дельта).

Легкие цепи по различиям первичной структуры C-областей делятся на два типа: каппа (κ) и лямбда (λ), которые также различаются между собой аминокислотным составом. Каждая из них может соединяться с любым изотипом тяжелых цепей. Легкие цепи в одной молекуле иммуноглобулина идентичны, это либо κ -тип, либо λ -тип. Легкие цепи типа λ могут быть подразделены на более мелкие подтипы на основании небольших различий в аминокислотных последовательностях. Соотношение двух типов L-цепей видоспецифично, у человека отношение $\kappa / \lambda = 2 : 1$.

Область, контактирующая с антигеном (паратоп, активный центр или антигенсвязывающий центр), располагается на N-конце Fab-фрагментов. Активный центр имеет определенную пространственную конфигурацию, определенное распределение положительных и отрицательных зарядов, гидрофобных и гидрофильных остатков аминокислот на своей поверхности. От этого зависит его способность специфически связываться с конкретным эпитопом, имеющим комплементарную структуру. Количеством активных центров в молекуле иммуноглобулина определяется валентность антитела. В молекуле иммуноглобулина всегда не меньше двух антигенсвязывающих центров, но один может быть завернут внутрь молекулы — это неполное антитело.

Взаимодействие эпитопа с активным центром идет по принципу «ключ — замок». Эпитоп антигена удерживается в активном центре за счет нековалентных связей всех типов (водородные связи, гидрофобные и электростатическое взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы взаимного притяжения). Энергия связи одной антигенной детерминанты с активным центром антитела определяется понятием «аффинность». А ф ф и н н о с т ь — это мера сродства активного центра антигенной детерминанте.

Чаще всего природные антигены содержат множество антигенных детерминант и способны взаимодействовать с несколькими антителами. Это свойство антигенов, а также поливалентность антител позволяют значительно повысить эффективность их связывания друг с другом. Суммарная энергия

связей мультивалентных антител с мультивалентным антигеном называется **а в и д н о с т ь ю**.

1.2.2. Изотипы, аллотипы и идиотипы

Иммуноглобулин, как и всякий белок, обладает антигенностью и выраженной иммуногенностью. В молекуле иммуноглобулина различают 4 типа антигенных детерминант: видовые, изотипические, аллотипические и идиотипические.

Видовые антигенные детерминанты характерны для иммуноглобулинов всех особей конкретного вида. Они определяются строением легкой и тяжелой цепей. По этим детерминантам можно идентифицировать видовую принадлежность антител.

Изотипические антигенные детерминанты (изотипы) представляют собой антигенные структуры константных областей иммуноглобулиновых цепей. На их основе дифференцируют продукты различных генетических сегментов, кодирующих константные домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Как уже отмечалось, у человека выделяют пять классов тяжелых цепей и два класса легких.

Аллотипические антигенные детерминанты (аллотипы) с генетических позиций отражают аллельные варианты конкретного гена (генетического сегмента). Они располагаются в константных областях легкой и тяжелой цепей и являются индивидуальными, то есть присущими конкретному организму. На основании строения аллотипических детерминант можно различать особей внутри одного вида. Аллотипы, как правило, формируются в результате точечных мутаций в генетических сегментах, ответственных за синтез константных областей различных цепей иммуноглобулинов.

Идиотипические антигенные детерминанты (идиотипы) расположены в вариабельных областях иммуноглобулинов (как в V_L -, так и в V_H -доменах) и отражают особенности строения антигенсвязывающего центра молекулы иммуноглобулина. Идиотипические детерминанты состоят из идиотопов. **И д и о т о п** представляет собой единичный сайт связывания для конкретной молекулы антиидиотипического антитела. Идиотопы могут располагаться в зоне связывания антигена и на каркасных участках. Каждое антитело имеет несколько идиотопов, сумма которых представляет его идиотип. **И д и о т и п** — уникальная характеристика антитела, отражающая его специфичность. Все антитела, продуцируемые отдельной плазматической клеткой, имеют один и тот же идиотип.

1.2.3. Характеристика классов антител (изотипов)

У человека и большинства млекопитающих выделяют пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. Принадлежность иммуноглобулина к определенному классу определяется типом тяжелой цепи — α , γ , μ , δ или ϵ .

Иммуноглобулины классов G и A подразделяются еще и на подклассы в зависимости от варианта тяжелых цепей. Например, пул IgG человека включает четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), пул IgA — два (IgA1, IgA2), различия между которыми состоят в строении С-областей тяжелых цепей.

Каждый класс иммуноглобулинов имеет свою структурную специфику, обусловленную:

- количеством протомеров (мономеров) в полимерной молекуле;
- длиной тяжелых цепей и количеством доменов в них;
- числом, положением и типом олигосахаридных фрагментов, связанных с Н-цепями;
- количеством и положением дисульфидных связей.

На рис. 1.9 приведено схематичное изображение иммуноглобулинов всех пяти классов. Данные о свойствах иммуноглобулинов разных классов и подклассов представлены в табл. 1.4 и 1.5.

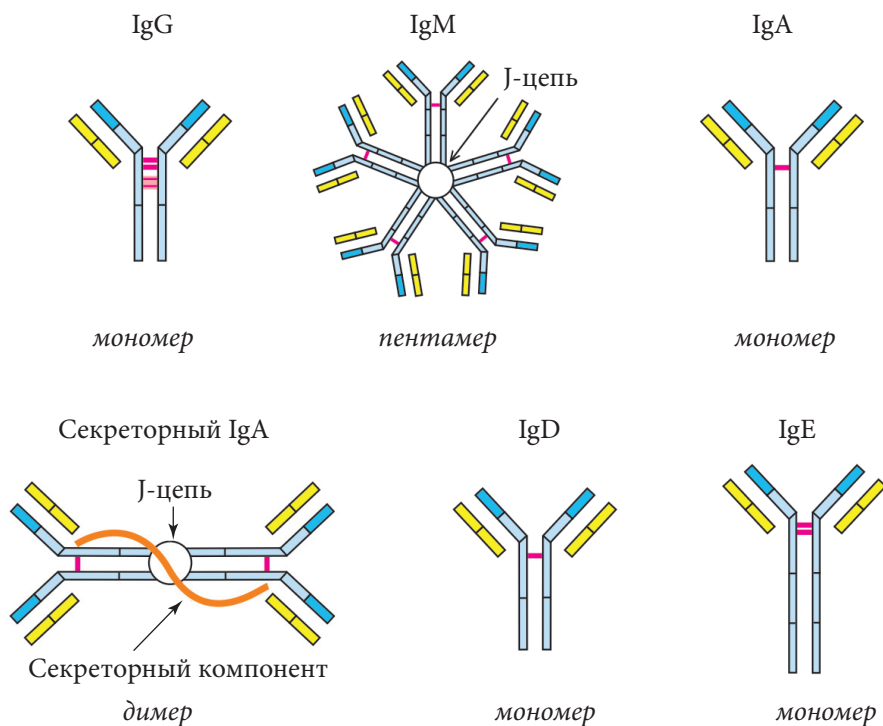


Рис. 1.9. Схематичное строение молекул иммуноглобулинов

У каждого класса иммуноглобулинов — своя биологическая роль.

Иммуноглобулины класса G имеют наибольшее значение и составляют основную массу иммуноглобулинов сыворотки крови. IgG — мономер, имеющий два антигенсвязывающих центра, то есть он может связать две молеку-

Общая характеристика иммуноглобулинов

Класс	Под-классы	Время полужизни, дни	Краткая характеристика
G	G1, G2, G3, G4	18–23	На долю IgG приходится около 80 % от всех иммуноглобулинов. Мономер, проходит через гематоплацентарный барьер, оказывает высокое противовоспалительное действие, тормозит синтез IgM
M	–	5–6,5	На долю IgM приходится около 6 % от всех иммуноглобулинов. Пентамер, появляется во время первичного иммунного ответа, обладает высокой биологической активностью
A	A1, A2	6	На долю IgA приходится около 13 % от всех иммуноглобулинов. Существует в двух формах — сывороточной (мономер) и секреторной (димер). Секреторной IgA (sIgA) обеспечивает местный иммунитет слизистых оболочек
E	–	2	На долю IgE приходится около 0,002 % от всех иммуноглобулинов. Мономер, обладает высокой цитотоксичностью к базофилам и тучным клеткам, участвует в аллергических реакциях
D	–	3	На долю IgD приходится около 0,2 % от всех иммуноглобулинов. Мономер, обнаруживается на поверхности В-лимфоцитов, биологическая роль до конца не выяснена

лы антигена. Данный класс иммуноглобулинов делится на четыре подкласса, каждый из которых выполняет свои функции по обеспечению вторичного иммунного ответа.

Иммуноглобулины класса G — единственные антитела, которые легко проходят через плаценту, благодаря чему они осуществляют иммунологическую защиту плода и обеспечивают естественный пассивный иммунитет новорожденного.

Эти антитела отвечают за длительный иммунитет, обеспечивают противомикробную защиту, связывают токсины, усиливают фагоцитарную активность, активируют систему комплемента, вызывают агглютинацию бактерий и вирусов.

Иммуноглобулины класса M не только циркулируют в крови, но и служат антигенраспознающими рецепторами В-лимфоцитов, будучи фиксированными на мембране клеток в виде отдельных мономеров. IgM сыворотки крови представляют собой пентамеры, имеющие 10 антигенсвязывающих центров. Эти иммуноглобулины — самые крупные. Каждая молекула IgM имеет одну

Таблица 1.5

Физико-химические и биологические свойства иммуноглобулинов человека

Свойство	Изотип иммуноглобулина									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgE	IgD
Тяжелая цепь	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	M	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1 / \alpha 2$	ϵ	δ
Средняя концентрация в сыворотке, мг/мл	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,05	0,00005	0,03
Молекулярная масса, $\times 10^3$	146	146	170	146	970	160	160	365	188	184
Содержание углеводов, %	2-3	2-3	2-3	2-3	12	7-11	7-11	7-11	12	9-14
Взаимодействие с FcR	++	-	++	+/-	-	-	-	-	+	-
Активация компонента	++ Классический путь	+	+++ Классический путь	-	+++ Классический путь	+	-	-	-	-

дополнительную полипептидную J-цепь (молекулярная масса ~15 кДа), которая участвует в образовании пентамера; J-цепь образует дисульфидные связи с тяжелыми цепями мономеров. Эти антитела (Аг) *низкоаффинны*, но *высокоавидны* из-за большого числа активных центров.

Через плаценту данные антитела не проникают. IgM — самые ранние антитела, при первичном иммунном ответе они первыми появляются в крови. Наличие IgM к антигену (Аг) конкретного возбудителя указывает на острый инфекционный процесс. Действие их направлено прежде всего против микроорганизмов.

Образование IgM к некоторым антигенам (например, к жгутиковым антигенам бактерий) осуществляется постоянно. К IgM относится значительная часть антител, вырабатываемых к антигенам грамотрицательных бактерий. В комплексе с антигеном IgM более эффективно активирует комплемент, чем IgG. Иммуноглобулины класса М опсонизируют, агглютинируют, преципитируют и лизируют содержащие Аг структуры.

Иммуноглобулины класса А существуют в сывороточной и секреторной формах. Сывороточный IgA представлен в виде мономера, секреторный — в виде димера, удерживаемого J-цепью. Помимо J-цепи большая часть молекул sIgA содержит секреторный компонент (пептидная цепь с молекулярной массой ~60 кДа), присоединенный к молекуле иммуноглобулина дисульфидными связями. Роль секреторного компонента заключается в защите IgA от протеолиза, что особенно важно в кишечнике.

Соответственно сывороточный IgA принимает участие в общем иммунитете, а секреторный (sIgA) обеспечивает местный иммунитет. Секреторные иммуноглобулины класса А защищают от кишечных, респираторных инфекций, определяют выраженность местного иммунитета; sIgA присутствуют в высокой концентрации в слюне, слезах, желчи, кишечном соке, в женском молоке, на слизистых дыхательных путей и половых органов (это препятствует адгезии микробов на эпителиальных клетках и генерализации инфекции в пределах слизистых оболочек).

Иммуноглобулины класса А нейтрализуют токсины и вызывают агглютинацию микроорганизмов и вирусов. Содержание IgA резко возрастает при заболеваниях верхних дыхательных путей, пневмониях, инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта и др.

Иммуноглобулины класса Е содержатся в крови в малом количестве. Особенности строения IgE являются наличие четырех доменов в C-области ϵ -цепи (как и в μ -цепи IgM) и отсутствие шарнирной области.

В отличие от иммуноглобулинов других классов IgE способны связываться со специфическими Fc-рецепторами клеток в свободном состоянии без предварительного образования комплекса «антиген — антитело». Большая часть

IgE связана с поверхностью тучных клеток и базофилов, которые концентрируются в подслизистом слое слизистых оболочек. Эти антитела активируют защитные силы организма, если «линия обороны» IgA «прорвана». Связывание фиксированных на поверхности клеток IgE с антигеном запускает ряд физиологических актов, направленных на удаление чужеродной субстанции из организма: секрецию слизи, усиление перистальтики кишечника, кашель, бронхоспазм. Именно IgE, специфичным к различным агентам окружающей среды, принадлежит патологическая роль в развитии аллергических реакций. Такие антитела получили название *реагины*. Их продукция может сопровождаться развитием астмы, сенной лихорадки, атопического ринита и других проявлений аллергии.

Реагины — непреципитирующие антитела, что затрудняет их выявление. Существует ряд методов определения IgE. Комплекс «реагин — аллерген» соединяется с субстратом, который обнаруживается радиологическими методами. Выявляют как суммарное общее количество IgE, так и уровень их содержания против того или иного аллергена (специфические реагины).

Концентрация в организме IgE повышается при инфекционных заболеваниях у взрослых и детей. Иммуноглобулины класса E принимают участие в нейтрализации токсинов, опсонизации, агглютинации и бактериолизисе с участием комплемента.

Иммуноглобулины класса D содержатся в крови в незначительном количестве по сравнению с другими иммуноглобулинами. Особенностью строения IgD является вытянутая открытая шарнирная область. Это делает молекулу очень гибкой и в то же время доступной действию протеолитических ферментов. Основная часть IgD входит в состав мембран В-лимфоцитов наряду с IgM, при этом специфичности иммуноглобулинов, представленных на одной клетке, совпадают. Функции IgD до конца не выяснены. Их количество увеличивается при некоторых вирусных заболеваниях. Предполагают, что IgD участвуют в аутоиммунных процессах.

1.2.4. Методы получения антител

В настоящее время при разработке различных диагностических наборов в качестве иммунореагентов используются как поликлональные, так и моноклональные антитела.

Поликлональные антитела (пАт) обладают способностью обнаруживать широкий круг антигенов. Однако пАт весьма гетерогенны по своим свойствам, поскольку образуются в результате функционирования различных клонов В-лимфоцитов. Их состав непостоянен и зависит от вида животного, его генетических особенностей и физиологического состояния.

В то же время для современного иммунохимического анализа чрезвычайно важны специфичность и стандартизованность применяемых антител. Это было достигнуто получением моноклональных антител (мАт). Препараты мАт характеризуются постоянством состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с чужими антигенами. Недостатками зачастую являются низкое сродство к субстрату (низкая аффинность) и неспособность преципитировать поливалентные антигены в силу своей моноспецифичности.

1.2.4.1. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела как реагенты для иммунохимического анализа применяют в виде иммунных сывороток, полученных путем иммунизации животных-продуцентов, а также выделенных из них гамма-глобулиновых фракций и аффинно очищенных антител.

Диагностические иммунные сыворотки применяют в различных иммунологических реакциях для идентификации возбудителя инфекционной болезни, выявления различных антигенов в биологических материалах. В клинической практике широко используются диагностические сыворотки для определения группы крови, проведения тканевого типирования, при аллогенных трансплантациях и переливаниях крови, для характеристики иммунологического статуса организма (определения классов иммуноглобулинов и др.).

Диагностические сыворотки готовят путем иммунизации чаще всего кроликов или морских свинок. При этом образуются антитела различной специфичности.

Первым этапом в технике получения иммунных сывороток является приготовление антигенов. Антигеном могут быть микробы или другие клетки, продукты жизнедеятельности микробов (например, токсины) и другие белковые вещества (например, сыворотка).

Далее проводится иммунизация животного путем внутривенных или подкожных инъекций антигена в возрастающих количествах, обычно с 5–8-дневными интервалами между инъекциями; количество инъекций зависит от цели иммунизации и характера антигена.

В вену антиген вводят при помощи стерильного шприца с тонкой иглой. Объем вводимой в вену жидкости обычно равен 0,5–1,5 мл. Если антигеном являются бактерии, то делают суспензию по стандарту из суточной культуры бактерий: последних убивают путем нагревания при 60 °С в течение 1 ч и вводят в вену 1 мл суспензии. При иммунизации эритроцитами их отмывают физиологическим раствором путем трехкратного центрифугирования и отсасывания жидкости над осадком, затем готовят 50 % взвесь эритроцитов в физиологическом растворе и вводят в вену 0,5 мл этой взвеси. При повторной иммунизации доза антигена увеличивается.

По окончании курса иммунизации у животных берут кровь. У кролика небольшое количество крови извлекают из краевой ушной вены. Большое количество крови извлекают непосредственно из сердца стерильным шприцем, после чего животному вводят подкожно такой же объем подогретого до 38 °С физиологического раствора.

Из собранной крови получают плазму, которую подвергают дефибринированию, фильтрационной очистке, консервированию и концентрированию. Затем сыворотки титруют на содержание антител, проверяют на стерильность и расфасовывают по ампулам. Хранят сыворотки на холоде и в темноте.

Диагностические сыворотки классифицируют **по составу** на поливалентные, моновалентные и монорецепторные.

Поливалентные диагностические сыворотки содержат антитела к сложному комплексу антигенов, общих для родственных микроорганизмов, и используются для определения рода возбудителя в реакции простой агглютинации.

Моновалентные диагностические сыворотки содержат антитела к одному виду возбудителя и используются для определения вида возбудителя в реакции простой агглютинации.

Монорецепторные диагностические сыворотки содержат антитела к одному специфическому антигену и используются для определения специфического антигена возбудителя в реакции простой агглютинации.

В зависимости **от характера иммунологических реакций** различают 6 видов диагностических сывороток.

Агглютинирующие сыворотки содержат антитела, под влиянием которых происходит склеивание (агглютинация) микробов, что сопровождается выпадением хлопьев или осадка. Применяются для определения рода, вида, типа возбудителя в реакции агглютинации.

Преципитирующие сыворотки содержат антитела, под действием которых происходит осаждение растворимых антигенов с образованием кольца или полос преципитации.

Гемолитические сыворотки содержат антитела, образующиеся при иммунизации животных эритроцитами. Обычно гемолитические сыворотки получают от кроликов, иммунизированных эритроцитами барана. Применяются для постановки реакции связывания комплемента и реакции гемолиза для определения титра комплемента.

Люминесцирующие сыворотки содержат антитела, меченные по Fc-фрагменту флуорохромом. Применяются для постановки прямой и непрямой реакции иммунофлуоресценции.

Сыворотки, содержащие антитела, **меченные** по Fc-фрагменту ферментом (чаще пероксидазой хрена). Применяются для постановки иммуноферментного анализа.

Антитоксические (нейтрализующие) **сыворотки** содержат антитоксические антитела (антитоксины). Применяются для постановки реакции нейтрализации.

Для увеличения относительного количества антител обычно используют γ -глобулиновую фракцию иммунной сыворотки. Наиболее полное выделение γ -глобулиновой фракции без снижения ее иммунологической активности достигается при осаждении сульфатом аммония, после чего осадок длительно диализуют с частой сменой буферных растворов. Другим широко распространенным способом является осаждение полиэтиленгликолем с молекулярной массой 4000–6000 Да. В 10–20 % растворе полиэтиленгликоля происходит агрегация всех белков с молекулярной массой более 150 000 Да, в результате чего осаждаются белки γ -глобулиновой фракции, а белки меньшей молекулярной массы остаются в растворе. Этот метод позволяет очень быстро получить препарат γ -глобулиновой фракции антисыворотки. Способ достаточно эффективный, если препарат не подвергается хранению при низких температурах. Длительное хранение полученного препарата без потери его иммунологической активности возможно после предварительного тщательного диализа.

С целью повышения чувствительности и специфичности анализа во многих случаях полезно использовать для сорбции на твердой фазе и для получения конъюгатов IgG-фракцию нативной сыворотки. Самый простой и доступный способ выделения IgG — метод ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе или ДЭАЭ-целлюлозе.

Для получения препаратов очищенных антител используется метод аффинной хроматографии на иммуносорбентах. Наиболее широкое распространение получили иммуносорбенты на основе CNBr-активированной сефарозы.

Обнаружение и количественное определение иммуноглобулинов разных классов проводят иммунологическими методами с помощью соответствующих антисывороток. Для определения количества антител используют методы преципитации (иммунная реакция осаждения антигена антителом), агглютинации (взаимодействие антитела с двумя клетками), нейтрализации бактерий и вирусов и др. Все чаще применяются радиоиммунные и ферментно-иммунные методы, обладающие исключительно высокой чувствительностью и позволяющие определять очень малые количества антител в смесях с другими веществами.

1.2.4.2. Моноклональные антитела

Гибридомная технология получения моноклональных антител была предложена в 1975 г. Георгом Келером и Цезарем Мильштейном. За разработку этой технологии им в 1984 г. была присуждена Нобелевская премия. Метод получения клеточных гибридов (гибридом) основан на слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов, взятых от иммунизированных

животных) с опухолевыми клетками. Гибридома наследовала от нормальной клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой клетки — способность к неограниченному числу делений (бессмертие).

Для получения гибридом наиболее подходящими оказались клетки плазмоцитомы (множественной миеломы) — опухоли, происходящей из плазматических клеток. Клетки плазмоцитомы по своей дифференцировке наиболее соответствовали антителообразующим клеткам — В-лимфоцитам, поскольку сохраняли способность к синтезу иммуноглобулинов.

Метаболическая селекция гибридов основывалась на том, что нормальные соматические клетки (В-лимфоциты) могут использовать два метаболических пути синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов: основной и резервный. По основному пути синтез нуклеотидов *de novo* осуществляется из аминокислот и углеводных предшественников, а по резервному — из гипоксантина (пурины) или дезокситимидина (пиримидины). Если по каким-либо причинам основной метаболический путь синтеза нуклеотидов блокируется, то в нормальных клетках используется резервный путь синтеза нуклеотидов. В такой ситуации включаются в работу ферменты гипоксантин-гуанидин-фосфорибозилтрансфераза (Г/ГФРТ) и тимидинкиназа, что обеспечивает синтез нуклеотидов по запасному пути. Для гибридизации с В-лимфоцитами были отобраны только мутантные клетки плазмоцитомы (миеломы), в которых не синтезируется Г/ГФРТ, то есть у этих клеток имелся только основной путь синтеза нуклеотидов (рис. 1.10).

Процесс получения гибридом состоит из семи этапов.

Этап 1. Иммунизация животных выбранным антигеном.

Мышей интенсивно иммунизировали определенным антигеном. На пике образования антител у животных удаляли селезенку и гомогенизировали ткань для получения суспензии В-клеток, продуцентов антител против введенного антигена.

Этап 2. Культивирование опухолевых клеток.

Этап 3. Слияние опухолевых клеток с «нормальными» лимфоцитами.

Клетки селезенки смешивали с клетками плазмоцитомы в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) — полиэлектролита, способствующего слиянию клеточных мембран. При слиянии В-лимфоцитов и клеток плазмоцитомы образовывались гибридные клетки. Гибридома сохраняла способность к клеточному делению, в процессе которого хромосомы обоих ядер перемешивались и образовывали одно общее ядро, содержащее гены обеих клеток-предшественников.

Этап 4. Селекция гибридом.

Для того чтобы отделить заданную гибридому от присутствующих в системе исходных клеток от гибридов иного состава, смесь клеток помещали в селективную среду (ГАТ-среду), содержащую гипоксантин, аминоптерин

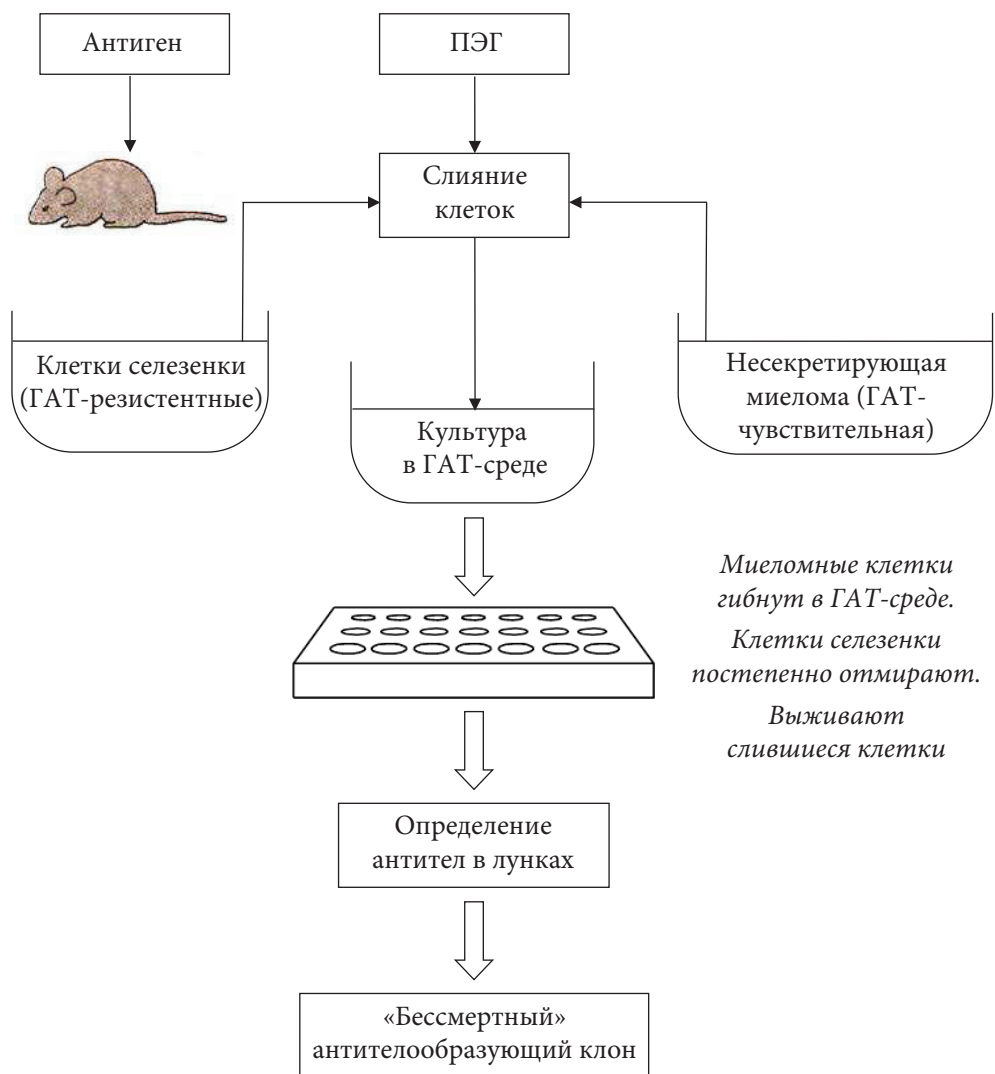


Рис. 1.10. Общая схема получения моноклональных антител

и тимидин. Аминоптерин, будучи высокотоксичным агентом, блокировал синтез нуклеиновых кислот *de novo*. Это приводило к гибели опухолевых клеток, не обладавших резервным путем синтеза нуклеиновых оснований. В-лимфоциты, способные расти в ГАТ-среде, будучи смертными, погибали естественным путем через 1–2 недели. В селективной среде выживали только гибридные клетки, сочетавшие свойства «бессмертных» опухолевых клеток и В-лимфоцитов, использующих резервный метаболический путь синтеза пуриновых оснований.

Этап 5. Культивирование полученных гибридом с целью выделения клона, продуцирующего необходимые антитела.

Выжившие в ГАТ-среде клетки помещали в пластиковые планшеты на 96 лунок емкостью 0,2 см³ (в каждую лунку — по 10 гибридом). После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяли на присутствие антител заданной специфичности. Клетки, содержащие такие антитела, клонировали, то есть повторно заносили в лунки, но из расчета 1 клетка на 1 лунку. Эта клетка-предшественник давала начало формированию «бессмертного» клона, продуцирующего моноклональные антитела. Процедура повторялась дважды.

Этап 6. Изучение полученных гибридом (определение специфичности, аффинности и др.).

Этап 7. Нарботка моноклональных антител *in vivo* или *in vitro*.

Выбранные гибридомы могут длительно культивироваться для получения больших количеств моноклональных антител, не содержащих посторонних антител и настолько однородных, что их можно рассматривать как чистые химические реагенты.

Для получения больших объемов жидкости, содержащей моноклональные антитела, гибридомы могут быть введены внутривбрюшинно мышам-реципиентам. В результате в брюшной полости размножаются гибридомы и накапливается асцитная жидкость, являющаяся источником большого количества мАт. В последние годы гибридомы размножают в аппаратах, приспособленных для выращивания культур клеток.

Полученные клоны гибридомных клеток можно хранить длительное время при –70 °С, как угодно долго культивировать на питательных средах, накапливая антитела, перевивать от одного подопытного животного другому.

Разработка технологии получения гибридом имела революционное значение для иммунологии, молекулярной биологии и медицины и позволила создать совершенно новые научные направления. Благодаря гибридомам возникли новые методы диагностики и лечения многих заболеваний. В наши дни моноклональные антитела стали одним из необходимых аналитических реагентов. В силу высочайшей специфичности, стандартности и технологичности мАт широко применяются как диагностикумы для определения широкого спектра биологически активных веществ: белков, гормонов, медиаторов воспаления, бактериальных и вирусных антигенов, различных ядов.

1.3. Система комплемента

Комплемент — система белков, которые циркулируют в крови и присутствуют на мембранах клеток. Это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов, участвует в реализации иммунного ответа организма и является важным компонентом как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Комплемент был открыт в конце XIX в. сотрудником лаборатории И. И. Мечникова Жюлем Борде как термолабильный фактор сыворотки крови (инактивируется при нагревании в течение 30 мин при 56 °C), вызывающий лизис бактерий после их обработки антителами. Ж. Борде назвал его алексином. Исторически закрепился термин «комплемент», введенный позже П. Эрлихом.

Система комплемента включает около 20 взаимодействующих компонентов. Все эти компоненты — растворимые белки с молекулярной массой от 24 000 до 400 000 Да, циркулирующие в крови и тканевой жидкости. Белки комплемента синтезируются преимущественно макрофагами и клетками печени, составляют приблизительно 5 % от всей глобулиновой фракции плазмы крови и обнаруживаются преимущественно в β -глобулиновой фракции. Большинство из них неактивны до тех пор, пока они не будут приведены в действие в результате иммунного ответа (с участием антител) или непосредственно внедрившимся микроорганизмом.

Часть сывороточных белков, относящихся к системе комплемента, обозначается латинской буквой С с добавлением арабской цифры номера компонента. Номер присваивался белкам в порядке их открытия и не соответствует очередности вступления в реакции. Некоторые белки получили название факторов с добавлением латинских букв В, D, H, I и т. д.

Продукты расщепления белков обозначаются так же, как исходные компоненты комплемента, но с добавлением строчных латинских букв (обычно для меньшего фрагмента — «a», а для большего — «b»). Например, расщепление белка C4 на фрагменты C4a и C4b, расщепление фактора В на фрагменты Вa и Вb. Активированные компоненты выделяют чертой над литерой, инактивированные компоненты — буквой i (например, iC3b).

Регуляторные белки чаще всего обозначают аббревиатурами, образованными из первых букв названий их функциональной активности. Например, белок, ускоряющий диссоциацию C3-конвертазы, обозначается аббревиатурой DAF (*decay accelerating factor*) или ФУД (фактор ускорения диссоциации).

1.3.1. Биологические функции системы комплемента

1. Цитотоксическая, или литическая функция. В конечной стадии активации системы комплемента из ее поздних компонентов образуется мембраноатакующий комплекс (МАК), разрушающий мембрану бактериальной или любой другой клетки.

2. Участие в воспалительных реакциях. Биологически активные компоненты С3а и С5а, которые образуются при расщеплении белков С3 и С5, приводят к высвобождению из тканевых базофилов (тучных клеток) и базофильных гранулоцитов крови медиаторов воспаления (гистамина, серотонина, брадикинина), стимулирующих воспалительную реакцию.

3. Опсонизирующая функция. В ходе активации системы комплемента образуются опсонизирующие компоненты, которые покрывают патогенные организмы или иммунные комплексы, привлекая фагоциты. Наличие на поверхности фагоцитирующих клеток рецептора к С3b усиливает их прикрепление к опсонизированным бактериям и активирует процесс поглощения.

Активируется система комплемента за счет каскадного процесса. Большинство ранних компонентов — это проферменты, последовательно активируемые путем протеолиза. Когда какой-либо из этих проферментов специфическим образом расщепляется, он становится активным протеолитическим ферментом и расщепляет следующий профермент и т. д. При активации комплемента у первых пяти компонентов происходит расщепление фракции на крупные и мелкие фрагменты. Поскольку многие из активированных компонентов прочно связываются с мембранами, большинство этих процессов происходит на поверхностях клеток.

1.3.2. Активация системы комплемента

Процесс активации комплемента можно разделить на определенные этапы:

- образование С3-конвертазы;
- образование С5-конвертазы;
- образование термостабильного комплекса С5b, С6, С7, С8, С9;
- перфорация мембраны.

Белок С3 — центральный компонент протеолитического каскада. Его активация путем расщепления представляет собой главную реакцию всей цепи активации комплемента. Комплемент активируется тремя биохимическими путями: классическим, лектиновым и альтернативным.

Классический путь (он был открыт первым, но эволюционно является новым) требует для своей активации наличия антител (специфический иммунный ответ, приобретенный иммунитет), в то время как альтернативный и лектиновый пути могут быть активированы антигенами без присутствия антител (неспецифический иммунный ответ, врожденный иммунитет). Состав

активного фермента С3-конвертазы, формирующейся классическим и лектиновым путями, одинаков; С3-конвертаза альтернативного пути включает другой набор компонентов. Итог активации комплемента во всех трех случаях одинаков: С3-конвертаза гидролизует белок С3, расщепляя его на фрагменты С3а и С3б и вызывая каскад дальнейшего гидролиза элементов комплемента и событий активации.

Поскольку в серологических реакциях с участием комплемента его активация происходит по классическому пути с участием иммунных комплексов «антиген + антитело», мы ограничимся рассмотрением именно этого способа.

Образование С3-конвертазы

Классический путь запускается активацией комплекса С1. Комплекс С1 включает белок С1q и по две молекулы сериновых протеаз С1r и С1s ($C1q + 2 C1r + 2 C1s$). Основой белка С1q является гексамерный коллагеноподобный стержень, распадающийся на 6 цепей, оканчивающихся глобулярными головками.

Активации комплемента предшествует взаимодействие антител иммуноглобулинов класса М и класса G (первых трех подклассов) с антигенами бактерий, вирусов и клеток. В результате взаимодействия происходит изменение конфигурации иммуноглобулина, что приводит к формированию места связывания для белка С1q на Fc-фрагменте вблизи шарнирного участка. Белок С1q соединяется с Fc-участком IgM или IgG, связанных с антигенами.

Активация комплекса С1 происходит исключительно между двумя Fc-фрагментами. Поэтому каскад активации может быть индуцирован даже одной молекулой IgM. В случае антител IgG необходимо соседство двух молекул антител. В связи с этим IgM является гораздо более эффективным инициатором цитолиза и иммунной опсонизации, чем IgG. Присоединение молекулы С1q к иммуноглобулинам вызывает ее конформационные изменения и активацию двух молекул сериновых протеаз С1r и С1s.

Активированный комплекс С1 связывается с белком С4 и расщепляет его на два фрагмента: С4а и С4б. Большой фрагмент С4б ковалентно связывается с поверхностью микробных клеток за счет реакционной тиоэфирной связи, которая стала доступной после отщепления меньшего фрагмента С4а.

Фрагмент С4б при гидролизе тиоэфирной связи приобретает повышенное сродство к белку С2 и присоединяет его к себе с образованием комплекса С4бС2.

Белок С2 в составе комплекса С4бС2 подвергается существенным конформационным превращениям, благодаря чему данный комплекс приобретает ферментативную активность. Вместе с тем этот фермент не стабилен.

Расщепление белка С2, катализируемое С1-комплексом, стабилизирует ферментный комплекс. Образуется комплекс С4бС2b, обладающий фермен-

тативной активностью. Это так называемая C3-конвертаза классического пути (рис. 1.11).

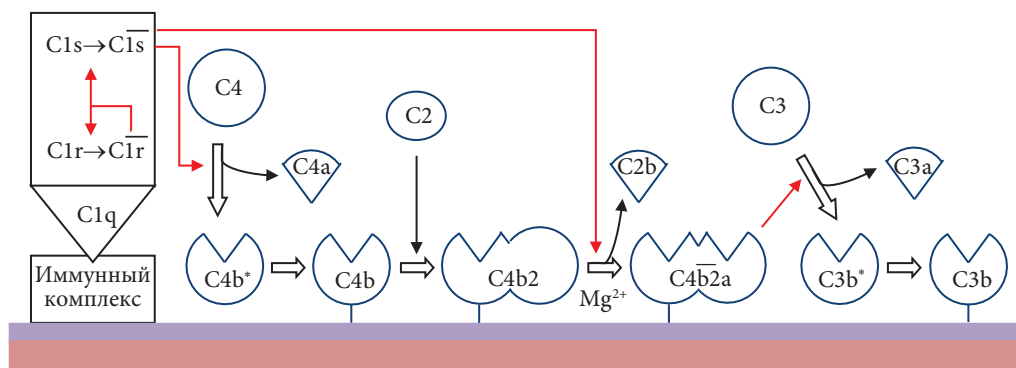


Рис. 1.11. Образование C3-конвертазы по классическому пути. Надбуквенной чертой обозначены активные ферменты; астериксом (звездочкой) — нестабильное состояние молекулы; красными стрелками показаны ферментативные реакции

Образование C5-конвертазы

Все три пути активации системы комплемента сходятся на компоненте C5, расщепляемом с помощью C5-конвертазы.

Активная фракция C3b присоединяется к комплексу C4bC2b классического пути. При этом образуется мембраносвязанная C5-конвертаза (C4bC2bC3b). C5-конвертаза расщепляет фракцию C5 до фрагментов C5a и C5b.

Малые фрагменты C5a (самый сильный) и C3a — анафилатоксины комплемента, то есть медиаторы воспалительной реакции.

Активная фракция C5b присоединяет фракцию C6, затем комплекс C5bC6 присоединяет фракцию C7.

Комплекс C5bC6C7 встраивается в фосфолипидный бислой мембраны микробной клетки.

К этому комплексу присоединяется белок C8, который катализирует олимеризацию 10–16 молекул белка C9. Данный полимер формирует в мембране микробной клетки неспадающую пору диаметром около 10 нм, что приводит к лизису микроба, так как на его поверхности образуется множество таких пор («деятельность» одной единицы C3-конвертазы приводит к появлению около 1 000 пор). Комплекс C5bC6C7C8C9, образующийся в результате активации комплемента, называется мембраноатакующим комплексом.

В иммуноанализе комплемент применяется как иммунореагент для постановки диагностических реакций. В качестве комплемента чаще всего используют свежую или высушенную сыворотку крови морской свинки, так как в ней содержится значительно больше комплемента, чем в сыворотках крови других

животных. Так как степень активности комплемента не у всех морских свинок одинакова, необходимо брать кровь у нескольких животных (3–5) и полученные сыворотки смешивать.

Перед постановкой реакции связывания комплемента проводят титрование последнего и определение рабочей дозы. Титр комплемента — это наибольшее разведение комплемента, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки. Рабочая доза комплемента — это количество комплемента, которое выше титра на 25 %.

1.4. Конъюгаты — меченые иммунореагенты

Конъюгаты — это антигены или антитела, меченные каким-либо веществом (ферментом, радиоизотопом, флуорохромом, металлами). Качество используемых конъюгатов является одним из важных факторов, влияющих на чувствительность, специфичность и воспроизводимость метода. При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность: фермент, например, — способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело — антигенность и антигенсвязывающую активность соответственно.

Наличие высокоочищенного меченого антигена позволяет использовать конкурентные методы. В этом случае на конечном этапе можно измерять активность конъюгата, не связанного с иммобилизованными антителами, что позволяет избежать процедуры отмывки и делает анализ более удобным. Однако антигены весьма разнообразны по своим физико-химическим свойствам и строению, а значит, невозможно разработать универсальные методики для получения конъюгата с ними. В каждом случае получение конъюгата антигена с ферментом представляет собой отдельную сложную задачу.

Конъюгаты ферментов с антителами и антигенами применяются в иммуноферментном анализе (ИФА). Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов катализируемой им реакции. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в молекуле многочисленных функциональных групп (сульфгидрильных, карбоксильных, остатков тирозина и др.), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать такими свойствами, как:

- высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа, при модификации и в конъюгате с антителами или другими белками;
- наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов ферментативной реакции;
- возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

Наибольшее применение в ИФА в соответствии с вышеназванными требованиями нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза (табл. 1.6).

Таблица 1.6

**Ферменты и их субстраты, наиболее широко используемые
в иммуноферментном анализе**

Фермент	Источник получения	Молекулярная масса, кДа	Субстрат	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза хрена	Хрен (<i>Armoracia rusticana</i>)	40	<i>o</i> -Фенилендиаминдигидрохлорид (ОФД). 5-Аминосалициловая кислота. Тетраметилбензидин (ТМБ). <i>o</i> -Дианизидин	Глутаральдегид. Периодат натрия. N-Сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат
β -D-галактозидаза	<i>E. coli</i>	540	<i>o</i> -Нитрофенил- β -D-галактозид	N,N'- <i>o</i> -Фенилендималеимид. <i>m</i> -Малеимидобензоил-N-гидрокси-сукцинимидный эфир
Щелочная фосфатаза	<i>E. coli</i> , слизистая кишечника телят	84–150	<i>o</i> -Нитрофенилфосфат. 5-Бром-4-хлоро-3-индолилфосфат	Глутаральдегид

Все три фермента стабильны и катализируют высокочувствительные реакции. Кроме того, продукты, получаемые в результате реакций, катализируемых этими ферментами, в зависимости от используемого субстрата могут выявляться методами не только колориметрическими, но и флуоресцентными. Другие ферменты используются значительно реже. Это объясняется их более низкой в сравнении с ПХ и ЩФ удельной активностью.

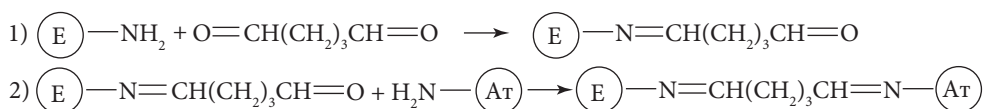
Для введения ферментной метки разработано много разных химических, биохимических и иммунологических способов. Методы получения конъюгатов белков с ферментами достаточно подробно освещены в соответствующей литературе. Мы рассмотрим те, что применяются наиболее часто.

Широкое распространение получили **ковалентные методы** приготовления конъюгатов для ИФА. Выбор реакции связывания определяется типом доступных функциональных групп в белковых молекулах. Используют следующие методы получения конъюгатов:

- 1) «сшивание» глутаровым альдегидом;
- 2) конъюгирование после периодатного окисления углеводов в составе гликопротеидов (пероксидаза);
- 3) «сшивание» N,N'-o-фенилендималеимидом (β -галактозидаза);
- 4) «сшивание» m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидом (β -галактозидаза).

Рассмотрим эти методы подробнее.

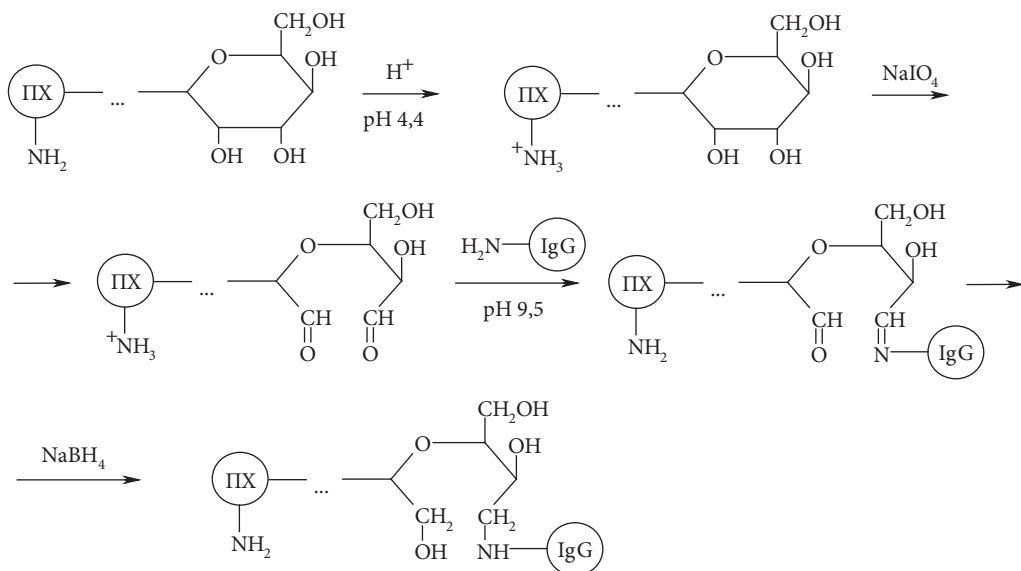
1. Первым реагентом, использованным для синтеза иммуноферментных конъюгатов, был глутаровый альдегид, реагирующий с ϵ -аминогруппами лизина белковых молекул. С помощью глутарового альдегида получают конъюгаты антител и антигенов с пероксидазой хрена и щелочной фосфатазой. Были разработаны одностадийный и двухстадийный методы синтеза. Первый применяется для получения конъюгатов с ЩФ, второй — с ПХ. При использовании одностадийного метода глутаровый альдегид добавляют к смеси фермента и белка, а при использовании двухстадийного на первой стадии глутаровым альдегидом обрабатывают только фермент, удаляют избыток альдегида, а затем уже к модифицированному ферменту добавляют белок.



Двухстадийный метод введения ферментной метки
в молекулу антигена через глутаровый альдегид

В целом эффективность конъюгирования глутаральдегидом одно- и двухстадийными методами невысока, выход конъюгата составляет 1–10 %. К достоинствам этих методов «сшивания» глутаровым альдегидом относятся их простота и то, что качество получаемого конъюгата удовлетворяет необходимым требованиям.

2. Наибольшее практическое применение для получения конъюгатов антител или белков с пероксидазой хрена нашел метод, основанный на окислении углеводного компонента фермента периодатом натрия.



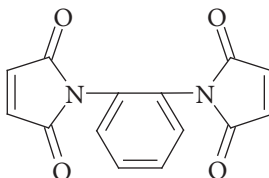
Конъюгирование антител и белков периодатным методом с использованием пероксидазы хрена

Данный метод основан на использовании полисахаридных цепей фермента для конъюгирования с антителами. Мягкое окисление остатков сахаров периодатом натрия создает активные альдегидные группы, способные взаимодействовать с аминогруппами иммуноглобулинов с образованием оснований Шиффа. Восстановление полученных оснований Шиффа боргидридом натрия приводит к формированию стабильных высокомолекулярных конъюгатов. Эффективность конъюгирования периодатным методом выше, чем эффективность «сшивания» глутаровым альдегидом.

Конъюгаты антител с пероксидазой стабильны и могут храниться при $+4^\circ\text{C}$. Обязательным условием при этом является наличие в растворе бактериостатических компонентов, препятствующих развитию микроорганизмов и протеолитической деградации белкового конъюгата.

Для длительного хранения конъюгатов при температуре -20°C в качестве криопротектора может использоваться глицерин (содержание в растворе — 50 %).

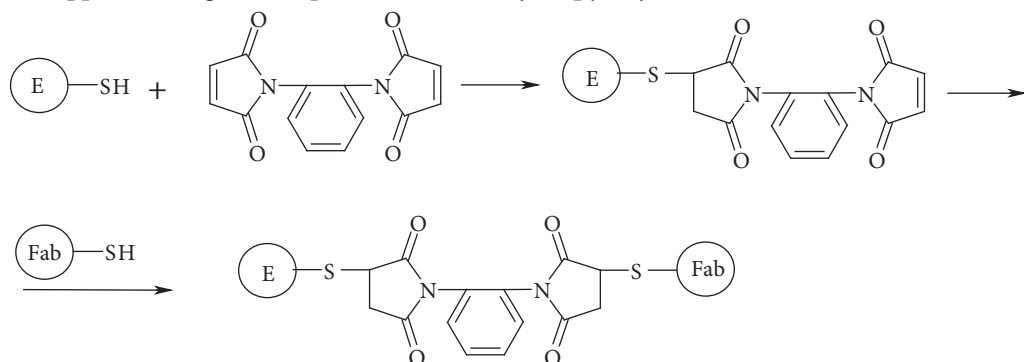
3. Для получения конъюгатов антител или их фрагментов с β -галактозидазой применяется N,N'-о-фенилендималеимид — гомобифункциональный сшивающий реагент, содержащий две малеимидные группы.



Малеимидные группы быстро реагируют с тиогруппой и медленно — с другими функциональными группами белков. Конъюгаты N,N'-*o*-фенилендималеимида получают с белками и ферментами, содержащими группы SH-, либо вводят эти группы восстановлением, например, дисульфидных связей.

Для образования тиольных групп молекулы антител, в которые надо ввести метку, вначале обрабатывают 2-меркаптоэтиламином или 2-меркаптоэтанолом для восстановления дисульфидных мостиков в шарнирной области. Затем проводят реакцию с N,N'-*o*-фенилендималеимидом. Интактность второй малеимидной группы модифицированного антитела обеспечивается избытком N,N'-*o*-фенилендималеимида в реакционной смеси. По окончании реакции избыток малеимида удаляют.

На второй стадии «малеимид — IgG» вводят в реакцию с тиольной группой нативной β -галактозидазы с образованием конъюгата, поскольку тиольные группы β -галактозидазы можно модифицировать без потери каталитической активности фермента. Аналогично можно сшивать с β -галактозидазой Fab-фрагмент IgG, содержащий тиольную группу.

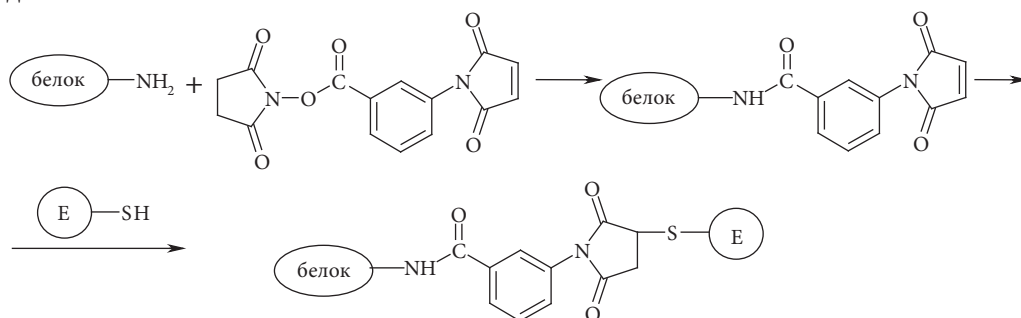


Получение конъюгатов антител или их фрагментов с β -галактозидазой при помощи N,N'-*o*-фенилендималеимида

Малеимидный метод позволяет точно предсказать участок антитела, удаленный от активного центра, с которым прореагирует фермент. Получение конъюгатов этим методом проводится при pH не выше 6,0–6,5, так как малеимидные группы нестабильны при высоких значениях pH. Конъюгаты β -галактозидазы с антителами, синтезированные с применением в качестве сшивающего реагента N,N'-*o*-фенилендималеимида, хорошо изучены и охарактеризованы.

Использование гомобифункциональных реагентов при синтезе конъюгатов затрудняет контроль реакции сшивки и приводит к появлению в реакционной смеси нежелательных продуктов. В результате целевой конъюгат образуется с низким выходом, что существенно усложняет процесс его очистки. Частично эти затруднения можно преодолеть посредством правильного выбора соотношения белок / реагент, pH, ионной силы и других параметров.

4. Возможность контроля за ходом реакции конъюгирования появилась с началом использования гетеробифункциональных сшивающих реагентов. Первым из них был применен N-гидроксисукцинимидный эфир *m*-малеимидобензойной кислоты.



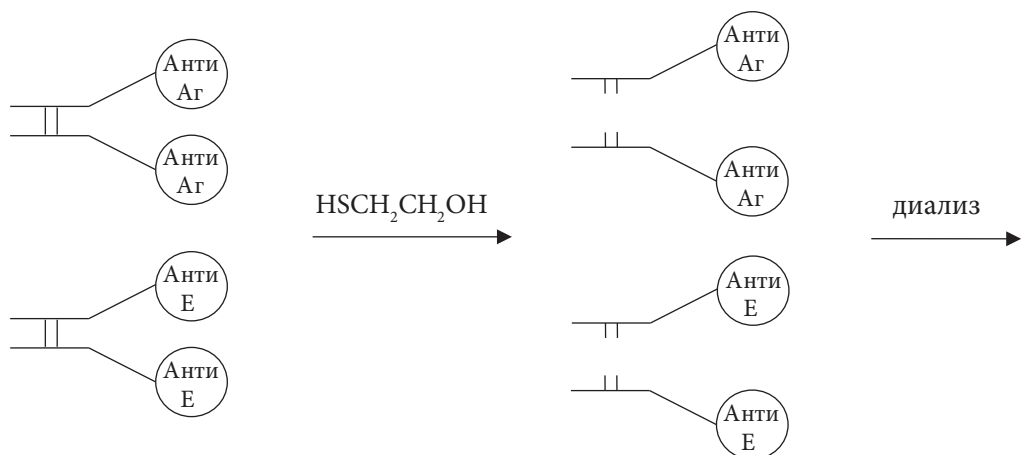
Конъюгирование β -галактозидазы с антителами при помощи N-гидроксисукцинимидного эфира *m*-малеимидобензойной кислоты

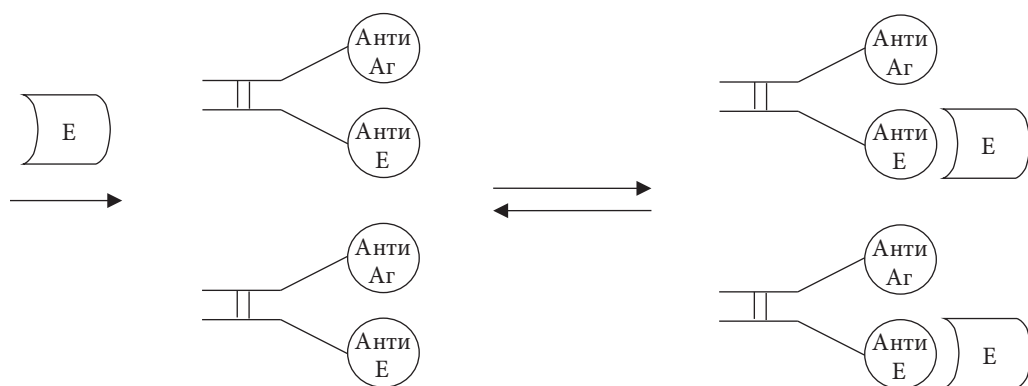
Данный метод основан на том, что гидроксисукцинимидный эфир селективно реагирует с аминогруппами антител с образованием пептидной связи, малеимидный остаток — с SH-группами β -галактозидазы.

Конъюгаты по этому методу получаются с высоким выходом, без образования каких-либо еще полимерных продуктов и имеют обычно состав 1 : 1. Ферментативная активность в конъюгате полностью сохраняется.

Ковалентные методы получения иммуноферментных конъюгатов нашли весьма широкое распространение, однако в некоторых случаях действие сшивающего реагента отрицательно сказывается на ферментативной и иммунологической активности компонентов гибридной макромолекулы. В связи с этим определенный интерес представляют **иммунологические методы** введения ферментной метки.

Один из подходов получил название метода «гибридных антител».





Метод «гибридных антител»

Ферментативным гидролизом получают Fab-фрагменты молекул антител двух видов: против определяемого антигена и используемого фермента. Затем смесь продуктов гидролиза подвергают восстановлению меркаптоэтанолом; при этом Fab-фрагменты обратимо диссоциируют на симметричные части. После удаления восстанавливающего агента молекулы снова ассоциируют, образуя гибридные молекулы антитела, специфичные и к определяемому антигену, и к ферменту. При добавлении фермента образуется комплекс «антитело — фермент».

Этот подход к введению ферментной метки привлекает своей «элегантностью», но недостатком метода «гибридных антител» является трудоемкость получения реагентов, что ограничивает его применение.

Гибридная технология открывает принципиально новый путь получения гибридных антител, который заключается в том, что сливаются моноклональные клетки, специфичные против данного антигена и фермента-маркера, в результате чего образуются гибридомы второго поколения, синтезирующие антитела с двумя специфичностями.

Другой путь заключается в том, что получают антитела одного и того же вида животного (например, кролика) против определяемого антигена и фермента, которые соединяют между собой через антитела животных другого вида (антитела барана против антител кролика). Добавление фермента к такой тройной молекуле также приводит к образованию комплекса «антитело — фермент». В настоящее время разрабатываются подходы к созданию гибридных антител методами клеточной и генной инженерии, что позволит существенно упростить способ их получения.

Стабильность иммуноферментных конъюгатов при хранении — важнейший параметр, обуславливающий возможность их практического использования. Методы направленной стабилизации конъюгатов пока еще не разра-

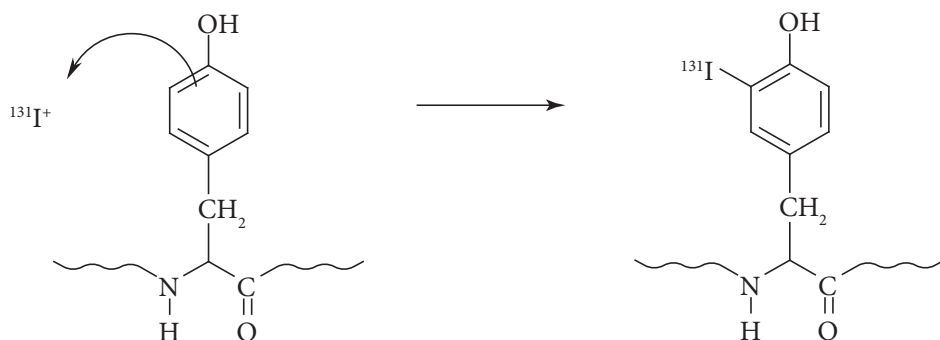
ботаны. Не существует также корреляции между стабильностью конъюгатов и методом их получения. Однако высокая стабильность гибридных молекул обеспечивает их применение на практике и значительно превосходит стабильность антител и антигенов, меченных радиоактивными изотопами. В лиофилизованном состоянии ферментные конъюгаты сохраняют свои свойства до двух лет.

При радиоиммунном анализе для мечения антигенов или антител используют радиоактивные изотопы ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C . Применение радиоактивной метки возможно, если меченые антигены и антитела сохраняют способность взаимодействовать друг с другом. Вид метки и ее активность зависят от цели исследования. Можно получить меченые соединения (например, антигены), иммунологические свойства которых идентичны немеченым антигенам. Высокую специфическую активность получают *in vitro* восстановительным метилированием (превращением аминогрупп в моно- или диметиламиногруппы). Этот метод позволяет без затруднений вводить в соединения двойную метку — ^3H и ^{14}C .

Широко распространено мечение белков радиоактивным йодом. Для этой цели используют изотопы ^{125}I и ^{131}I , которые позволяют получать препараты с высокой специфической активностью. Чаще всего применяют изотоп йода ^{125}I , он имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную радиоактивность и является источником чистого γ -излучения.

Мечение белка основано на его взаимодействии с высвобождающимся при окислении свободным радиоактивным йодом. Существуют два способа введения радиоактивных изотопов йода: прямой и косвенный.

Согласно прямому способу находящийся в виде электрофильного йода (I^{+1}) ^{131}I атакует ароматические остатки аминокислот белков или пептидов.



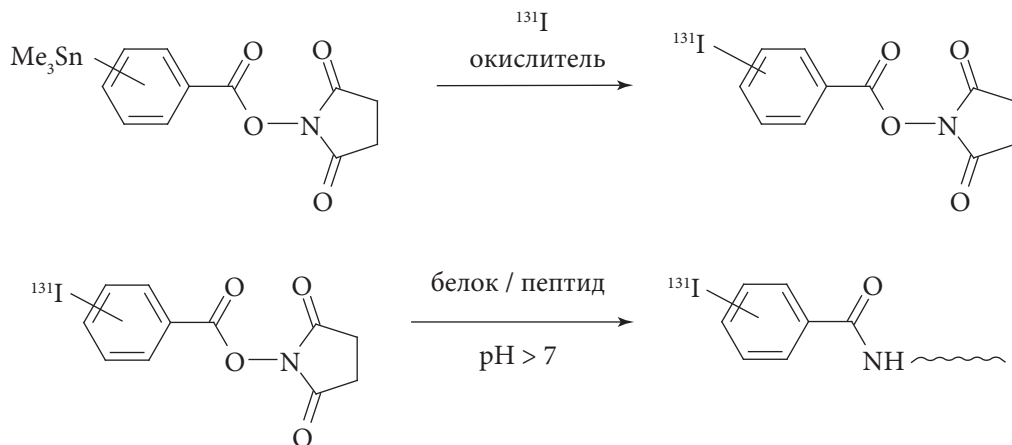
Прямое йодирование

Если реакцию проводят при физиологическом значении pH, йод присоединяется главным образом к тирозину. Повышение pH приводит к взаи-

модействию йода с сульфгидрильными группами, а также с гистидином и триптофаном. Прямой способ йодирования — быстрый и простой метод, обеспечивающий высокий выход целевого продукта с высокой удельной радиоактивностью.

Помимо таких окислителей, как персульфаты, йодаты, нитриты, гипохлориты, перекись водорода широкое применение нашли хлорид йода, хлорамин Т, электрохимический метод. После маркирования белок отделяют от несвязавшегося йода и продуктов окисления при помощи гель-фильтрации, диализа, осаждения, ионообменной хроматографии и других методов. Меченые продукты проверяют в отношении электрофоретических и иммунологических свойств, а также стабильности. Для сохранения исходных свойств белков степень йодирования не должна превышать 1.

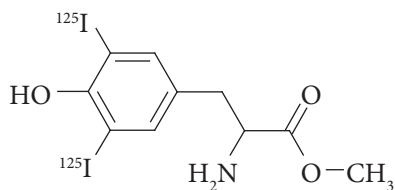
Если прямое йодирование осуществить невозможно (например, если молекула не содержит тирозин), то для введения метки в препарат используют промежуточные молекулы — линкеры.



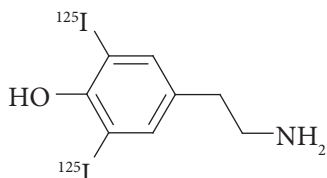
Непрямое радиойодирование
через линкер N-сукцинимидилтриметилстаннилбензоат

Линкер должен содержать две функциональные группы, одна из которых обеспечивает быстрый и эффективный захват радиоактивного йода, а другая — быстрое и эффективное присоединение к белкам, например к аминогруппе лизина или к тиольной группе цистеина. Дополнительное преимущество косвенного мечения состоит в том, что биологическими свойствами меченого иммунореагента можно управлять путем целенаправленного подбора линкера.

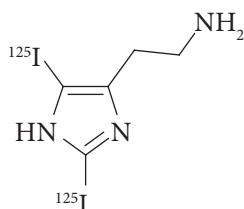
Рассмотрим формулы некоторых линкеров для непрямого радиойодирования белков.



Метилловый эфир тирозина



Тирамин



Гистамин

Йодированные соединения, которые могут использоваться для введения изотопа ^{125}I в молекулу лиганда

Изотоп ^{125}I вводят в бычий сывороточный альбумин при помощи хлорамин Т (натриевая соль N-моноклор-п-толуолсульфонамида) и электрохимическим способом маркирования ферритина (взаимодействие со свободным радиоактивным йодом, выделяющимся в ходе анодного окисления йодидов). Используют изотоп ^{125}I в виде изотонического раствора йодида натрия, не содержащего носителя и восстанавливающих примесей. Ферментативное йодирование позволяет получать препараты с высокой удельной активностью. Физико-химические и иммунологические свойства белка остаются при этом неизменными. Основные сложности связаны с выбором фермента, так как можно использовать далеко не всякую пероксидазу. Для радиойодирования наиболее подходящим ферментом является лактопероксидаза.

Явление флуоресценции было использовано для визуализации микроскопических биологических объектов еще в начале XX в., в том числе и для объектов, не обладающих собственной флуоресценцией, но выявляющихся благодаря флуоресценции веществ, которые с этими объектами могут специфически связываться. Способные флуоресцировать атомы, молекулы и молекулярные комплексы называют флуорофорами или флуорохромами. В исследовательской практике ковалентно присоединенный к макромолекуле флуоресцирующий компонент принято называть флуоресцентной меткой, а свободный флуорофор — зондом.

Флуоресцентные метки — это обычно красители с поглощением и флуоресценцией в видимой области спектра и с большим квантовым выходом. Их ковалентно связывают с определенными биологическими молекулами. Такие метки являются основной иммунофлуоресцентного анализа.

Флуоресценция — это физическое явление, заключающееся в способности некоторых веществ после поглощения света с одной длиной волны излучать свет с другой, большей, длиной волны. Каждый флуорофор характеризуется определенным спектром поглощения и испускания.

В качестве меток для флуоресцентного иммунного анализа (ФИА) используют различные флуоресцентные красители. Выбор флуорофора диктуется целью исследования, характером объекта, природой флуоресцирующего вещества, его кислотностью, цветом и др.

По физико-химическим свойствам флуоресцентные красители можно разделить на три группы.

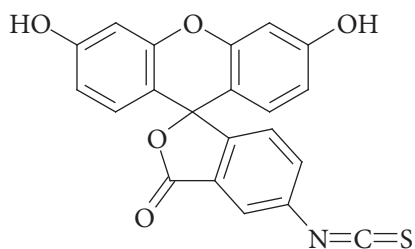
1. Щелочные флуорофоры. Характеризуются тем, что находятся в кислой среде в сильно диссоциированном состоянии. Флуоресцирующим компонентом краски является положительно заряженный катион. В сильно щелочных растворах такие красители находятся в недиссоциированном состоянии.

2. Кислые флуорофоры. Диссоциируют в щелочной среде. Флуоресцирующим компонентом красителя является отрицательно заряженный анион.

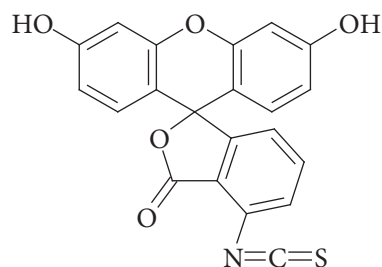
3. Электронеутральные флуорофоры. Слабокислые или слабощелочные красители, диссоциация которых не имеет практического значения, поскольку флуоресцирующими свойствами обладает целая молекула.

Наиболее часто применяют ФИТЦ — флуоресцеин изотиоцианат (зеленое свечение), ТРИТЦ — тетраметилродаминизотиоцианат, РСХ — родамин сульфохлорид (красное свечение), фикоэритрин (оранжевое свечение), родамин (красное свечение).

ФИТЦ представляет собой производное флуоресцеина, функционализированное изотиоцианатом. Доступен в виде смеси изомеров: флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ-5) и флуоресцеин-6-изотиоцианата (ФИТЦ-6).



ФИТЦ-5



ФИТЦ-6

Структура ФИТЦ-5 и ФИТЦ-6

В водной среде ФИТЦ имеет λ_{max} поглощения 495 нм, а λ_{max} испускания — 519 нм (зеленое свечение).

Введение изотиоцианата ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$) в молекулу флуоресцеина делает ФИТЦ реакционноспособным по отношению к нуклеофилам и позволяет присоединить флуорофор к amino- и тиольным группам белков.

Другим общеизвестным флуорофором является ТРИТЦ — тетраметилродамин-5-(6)-изотиоцианат. В отличие от ФИТЦ он имеет максимум возбуждения в зеленой области спектра (550 нм), максимум излучения — 573 нм (желтая область спектра).

Антитела, соединенные с флуорофором, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Для получения антител используют высокоактивные гипериммунные сыворотки, из которых выделяют антитела и метят их флуорофором.

Для получения конъюгата белок метят флуорофором в условиях, позволяющих получить белковые молекулы с оптимальным молярным отношением $M_{\text{ФИТЦ}} : M_{\text{белок}}$. Оптимальное молярное отношение флуорохром / Ig составляет 2–3 для ФИТЦ и 1–2 для ТРИТЦ. После введения метки избыток красителя удаляют. Очищенный конъюгат центрифугируют и консервируют мертиолатом натрия. В готовом препарате устанавливают титр антител в реакции иммунодиффузии на агаре.

Одним из важнейших компонентов современных иммунохимических тест-систем, обычно используемых в качестве метки, являются наночастицы коллоидного золота (КЗ). Иммунореагенты, меченные КЗ, нашли широкое применение в иммунохроматографических экспресс-тестах, которые выявляют антитела и антигены в различных биологических материалах.

Коллоидное золото соответствует всем требованиям, предъявляемым к идеальным маркерам: легко различимо в электронном микроскопе, имеет заданный размер, форму и структуру, стабильно к процессам агрегации, прочно связывается с биомолекулами без снижения их активности.

К настоящему времени разработаны методы получения достаточно стабильных гомодисперсных зольей золота с заданным размером частиц. Для конъюгатов иммунохроматографических тест-систем оптимальным является диаметр сферических частиц 25 ± 5 нм.

Получение конъюгата коллоидного золота с антителами включает приготовление и очистку водных растворов антител, определение «золотого числа» (минимального количества белка, защищающего золь против солевой агрегации), соединение пробы с меткой, добавление вторичного стабилизатора.

Каждая коллоидная частица имеет в воде отрицательный заряд и обладает гидрофобными свойствами. В присутствии электролитов энергетический барьер, обеспечивающий сохранение частиц в диспергированном состоянии,

нарушается, и частицы агрегируют. При работе с коллоидным золотом и его конъюгатами важно использовать буферные растворы с ионной силой ниже 0,01 М или бидистиллированную воду. Эффективность адсорбции белков КЗ зависит и от рН инкубационной среды, и от количества внесенного белка, поэтому в каждом конкретном случае необходимо определять оптимум рН и оптимальное значение вносимого белка.

Перед конъюгацией с коллоидным золотом антитела диализируют против 1 000-кратного объема 10 мМ солевого буфера. Для синтеза конъюгата к КЗ добавляют карбонат калия до достижения необходимого рН, а затем — моноклональные антитела выбранной концентрации (в соответствии с выявленным «золотым числом»). Смесь инкубируют 30 мин, интенсивно перемешивая, при комнатной температуре. С целью блокировки свободных сайтов поверхности наночастиц КЗ и вторичной стабилизации конъюгата к нему добавляют раствор ПЭГ-20М и азид натрия и перемешивают на мешалке в течение 15 мин. Также в качестве стабилизатора используют раствор бычьего сывороточного альбумина и сахарозу.

Для освобождения конъюгата от несвязавшихся белков и частиц коллоидного золота применяют скоростное центрифугирование при 4 °С, затем супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в фосфатном буфере, содержащем бычий сывороточный альбумин, сахарозу и азид натрия.

2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

2.1. Закономерности взаимодействия $Ag - Ab$

Иммунохимические методы исследования — это диагностические методы, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител. Достоинствами иммунохимических методов являются их специфичность, высокая чувствительность и относительная простота. Чувствительность иммунологических методов исследования превосходит чувствительность всех других методов исследования антигенов и антител. Например, радиоиммунный и иммуноферментный анализы позволяют улавливать присутствие белка в количествах, измеряемых в нанограммах и даже в пикограммах.

В основе реакции «антиген — антитело» лежит взаимодействие между эпитопом антигена и активным центром (паратопом) антитела, основанное на принципе комплементарности. Это взаимодействие состоит в установлении между эпитопом и активным центром антитела нековалентных химических связей следующих типов:

- электростатические связи; включают ионные (между заряженными группами аминокислотных остатков, например карбоксильными группами и аминогруппами) и полярные (связанные с формированием диполей) взаимодействия;
- водородные связи (формирование водородных мостиков между гидрофильными группами);
- гидрофобные связи (обусловлены энергетическими преимуществами контакта гидрофобных участков молекул между собой);
- силы Ван-дер-Ваальса (взаимодействие электронных облаков).

Описанные нековалентные взаимодействия проявляются только при близком контакте молекул. Так, интенсивность электростатических взаимодействий убывает пропорционально квадрату расстояния, а интенсивность ван-дер-ваальсовых сил — пропорционально 7-й степени расстояния. Столь маленькое расстояние между молекулами может быть достигнуто только за счет комплементарности эпитопа и активного центра антитела.

Таким образом, для взаимодействия эпитоп антигена и активный центр антитела должны точно соответствовать друг другу, что часто сравнивают

с взаимодействием типа «ключ — замок». Из-за того, что во взаимодействие между антигеном и антителом вовлечены слабые силы, комплекс «антиген — антитело» может диссоциировать под влиянием низкого или высокого рН или гиперосмолярности раствора, эффективно разрушающих водородные связи.

Процесс взаимодействия антигена с антителом протекает в две фазы.

1. Специфическая фаза — фаза взаимодействия. В это время происходит комплементарное соединение активных центров антител (паратопов) и эпитопов антигена. Обычно специфическая фаза длится несколько секунд или минут.

2. Неспецифическая фаза — фаза проявления. Характеризуется внешними признаками образования иммунных комплексов. Эта фаза может занимать от нескольких минут до нескольких часов.

Оптимальное специфическое взаимодействие антител с антигеном происходит в изотоническом растворе с рН, близким к нейтральному.

Аффинность — это мера прочности связи, образуемой между эпитопом антигена и активным центром антитела.

Взаимодействие между антителом и антигенным эпитопом удобно рассматривать на примере реакции между антителом и моновалентным гаптеном. Поскольку молекула антитела симметрична и имеет два идентичных антиген-связывающих Fab-фрагмента, при связывании одной молекулы антитела с двумя идентичными моновалентными гаптенами каждый Fab-фрагмент независимо соединяется с одной молекулой гаптена. Реакция моновалентного антигена (Аг) с сайтом антитела может быть представлена уравнением



где k_1 — константа скорости образования комплекса; k_2 — константа скорости диссоциации комплекса.

Уравнение (1) отражает состояние равновесия в растворе связанных и несвязанных компонентов реакции при постоянной температуре, постоянном давлении, постоянном значении рН, постоянном солевом составе среды.

Взаимодействие антигена с антителом обратимо и подчиняется закону действия масс, на основе которого можно рассчитать константу равновесия образования и диссоциации иммунных комплексов:

$$\vec{V} = k_1 \cdot [Ag] \cdot [At]; \quad \vec{V} = k_2 \cdot [Ag - At].$$

В состоянии равновесия $\vec{V} = \vec{V}$, то есть

$$k_1 \cdot [Ag] \cdot [At] = k_2 \cdot [Ag - At];$$

$$K_{acc} = K_{равн} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[Ag - At]}{[Ag] \cdot [At]}. \quad (2)$$

Константа ассоциации (K_{acc}) является мерой аффинности (сродства) антитела и антигенного эпитопа и может рассматриваться как показатель специфичности антител к данному эпитопу.

Если антиген и антитело не комплементарны друг другу, то равновесие (1) будет смещено влево, и комплексы образовываться не будут. При этом $k_2 > k_1$ и $K_{acc} < 1$.

Высокая степень сродства иммунореагентов смещает равновесие вправо: $K_{acc} > 1$. Большое значение K_{acc} означает, что при достижении равновесия концентрация комплекса $Ag - At$ намного превышает концентрации свободных антигена и антитела.

Меняя в стандартных условиях концентрации $[Ag]$ и $[At]$ и оценивая при этом концентрацию образовавшегося комплекса $[Ag - At]$, можно определить K_{acc} .

Определение константы ассоциации

Константа ассоциации может быть определена с использованием метода равновесного диализа, наиболее распространенного метода изучения реакции «антиген — антитело». Метод основан на различиях в способности антител и гаптена проходить через полупроницаемые мембраны. Для этого используют растворы антител и гаптена известной концентрации в одинаковых буферах для того, чтобы исключить разницу в показателях pH и ионной силы.

Раствор антител вносят в диализный мешок, который помещают в раствор гаптена. Молекулы антител не проходят через мембрану, молекулы гаптена диффундируют через нее по градиенту концентрации в раствор антител и частично связываются с ними. Состояние равновесия достигается, когда концентрации свободного гаптена становятся одинаковыми по обе стороны мембраны. Однако общее количество гаптенa будет большим в диализном мешке, поскольку часть из них начнет связываться с молекулами антител. Длительность диффузии зависит от проницаемости мембраны, природы гаптена и температуры. Измерив равновесную концентрацию свободного гаптена по обе стороны мембраны, можно определить количество гаптена, связанного с антителами, и рассчитать константу ассоциации. Чем больше K_{acc} , тем выше аффинность антител и гаптена (рис. 2.1).

В качестве растворителя чаще всего используют 0,01 М фосфатный буфер с pH 7,4 или 0,1 М трис-HCl-буфер, pH 7,4. Величина pH и ионная сила могут варьироваться в зависимости от целей эксперимента. Для уменьшения эффекта Доннана целесообразно использовать забуференный 0,15 М раствор NaCl. Выбор концентрации гаптена и антител зависит от ожидаемой величины константы равновесия (табл. 2.1).

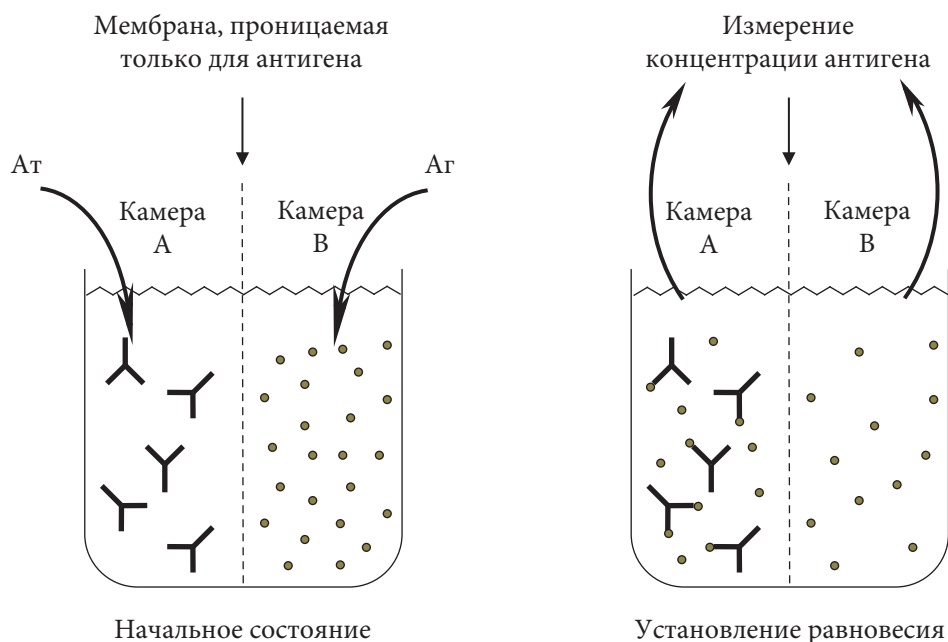


Рис. 2.1. Определение константы ассоциации реакции антигена с антителом с помощью метода равновесного диализа

Таблица 2.1

Примерная концентрация антител для равновесного диализа при различных константах ассоциации

Константа ассоциации, M^{-1}	Концентрация антител, г/л
1×10^5	3,6
1×10^6	0,36
1×10^7	0,36

Постановка опыта. В ячейку для диализа (в данном случае — в диализный мешок) вносят 2 мл раствора антител. Завязанный с обоих концов мешок помещают в подходящий сосуд (например, в закрывающуюся стеклянную пробирку 10×75 мм). Затем в жидкость, против которой ведут диализ, вносят 2 мл раствора гаптена.

Для эксперимента используют несколько пробирок с различными исходными концентрациями гаптена, это позволяет получить более точные значения константы ассоциации. Кроме того, необходимо проводить контрольный диализ, для чего диализные мешки, внутри которых находится только буфер, помещают в растворы гаптена с различными (по меньшей мере, двумя) концентрациями. Это необходимо для фиксации момента наступления равновесия. Можно также определить количество гаптена, неспецифически связанного

с материалом диализного мешка. Пробирки с образцами устанавливают в штатив и инкубируют в термостате при постоянном покачивании или вращении. Время наступления равновесия может колебаться от 4 ч при 30 °С до 20–40 ч при более низкой температуре.

Определение концентрации гаптена. Концентрацию окрашенных гаптен можно определять с помощью спектрофотометрии. Для измерения концентраций гаптен, меченных радиоактивными изотопами, применяют счетчики ионизирующего излучения. Сначала выявляют в отсутствие антител количество неспецифически связанного гаптена. Это можно сделать, измерив количество гаптена в диализном мешке и в жидкости, омывающей мешок, после наступления равновесия. Количество неспецифически связанного гаптена равно разности между первоначально внесенным количеством гаптена и суммарным количеством гаптена по обе стороны диализной мембраны. В табл. 2.2 приведены примеры подобных определений для пяти исходных концентраций. Условия опыта следующие: в диализной жидкости — 2 мл ^{14}C -2,4-динитроанилина, внутри диализного мешка — 2 мл буферного раствора (0,1 М трис- HCl , pH 7,4; 0,1 М KCl). Продолжительность диализа составляет 5 ч при 30 °С в условиях медленного вращения; специфическая активность гаптена — 520 имп/нмоль. Измерения проводили с помощью жидкостного сцинтиляционного счетчика.

Таблица 2.2

Определение количества неспецифически связанного гаптена

Исходная концентрация, 10^{-6} М	Равновесная концентрация при отсутствии неспецифического связывания, 10^{-6} М	Измеренная концентрация в равновесном состоянии		Неспецифическое связывание, % от концентрации свободного гаптена
		внутри	снаружи	
9,82	4,91	4,39	4,40	11,6
8,06	4,03	3,51	3,46	15,6
5,20	2,60	2,20	2,24	17,1
2,55	1,27	1,09	1,09	16,5
1,04	0,52	0,455	0,476	11,8

Сведения, приведенные в табл. 2.3, представляют собой средние значения данных, полученных в двух одинаковых измерительных стаканах. Учет неспецифически связанного гаптена облегчает расчет количества гаптена, связанного антителами.

Условия опыта: диализная жидкость вне мешка — 2 мл ^{14}C -2,4-динитроанилина в различных концентрациях. В диализном мешке — 2 мл раствора антител (240 мкг/мл очищенных антител, специфичных к динитрофенильной

Определение количества гаптена, связанного антителами.**Результаты измерений**

Концентрация гаптена в диализной жидкости (вне мешка) перед началом опыта, 10^{-6} М	Концентрация свободного гаптена в диализной жидкости при равновесии, 10^{-6} М	Равновесная концентрация гаптена после внесения поправки, 10^{-6} М	Количество гаптена, связанного антителами, нМоль	Число молей связанного гаптена на 1 моль антител
9,82	3,34	4,41	4,28	1,60
8,06	2,52	3,65	4,52	1,69
5,20	1,41	2,39	3,92	1,47
2,55	0,48	1,20	2,88	1,08
1,03	0,083	0,51	1,71	0,64

детерминанте). Буфер: 0,01 М трис-HCl; pH 7,5; 0,1 М KCl; продолжительность диализа — 5 ч при медленном вращении и температуре 30 °C.

Результаты измерений представлены в табл. 2.3 совместно с данными расчета. Поправка на неспецифическое связывание антигена была принята равной в среднем 15 %.

Оценка метода. Методы определения гаптенов могут варьироваться в зависимости от природы гаптена и ожидаемой константы ассоциации. При использовании окрашенных гаптенов в значениях констант ассоциации от 10^3 до 10^5 М⁻¹ можно измерить концентрацию гаптена по оптимальной плотности. При исследовании систем с $K_{acc} > 10^6$ М⁻¹, когда нужны более чувствительные методы, целесообразно использовать гаптены, меченные ¹⁴C. Радиоактивные гаптены весьма эффективны для определения K_{acc} в области 10^6 – 10^7 М⁻¹. Для определения констант ассоциации в области 10^7 – 10^8 М⁻¹ необходимы гаптены, меченные тритием. При еще более высоких константах ассоциации гаптен находится в основном в связанном состоянии, и его прямое определение затруднено. Следует также учитывать, что при низких K_{acc} необходимые для проведения измерений количества гаптена должны быть достаточно высокими, чтобы определить разницу между свободным и общим гаптеном внутри диализного мешка. Вследствие этого точное измерение концентрации антител затруднено. При проведении равновесного диализа не обязательно использовать высокоочищенные антитела.

Результаты выражают в координатах Скэтчарда, используемых при количественной оценке параметров связывания различных веществ (например, лекарственных средств и их рецепторов).

Когда все антитела, которые связывают соответствующие гаптены или антигенные эпитопы, идентичны (как в случае моноклональных антител), константа K представляет собой внутреннюю константу ассоциации. Однако по причине того, что сывороточные антитела, даже те, которые взаимодействуют только с единственным эпитопом, гетерогенны, средняя константа ассоциации всех антител к эпитопам обозначается как K_0 .

Взаимодействие между антителами и каждым эпитопом поливалентного антигена подчиняется кинетике и силам, сходными с теми, что участвуют во взаимодействии между антителами и гаптенами, поскольку каждый эпитоп антигена реагирует с соответствующим антителом тем же образом, о котором было рассказано ранее.

Кроме того, в этом исследовании могут быть использованы разные концентрации гаптенов, тогда как концентрация антител, помещенных в диализную камеру, остается постоянной. Этот подход применяется в ситуации, когда нужно определить, являются ли исследуемые препараты антител гомогенными (например, моноклональные антитела) или гетерогенными (например, поликлональная антисыворотка), или измерить среднюю константу аффинности (K_0).

Как правило, метод равновесного диализа применяется для низкомолекулярных соединений. Это обстоятельство существенно ограничивает область использования данного метода. К недостаткам метода равновесного диализа нужно также отнести относительно большое время достижения равновесия и необходимость учета эффектов, вызываемых присутствием мембраны, в результате чего необходимо работать с достаточно высокими концентрациями реагентов, что значительно понижает чувствительность определения константы связывания.

Определение концентрации свободного и связанного антигена

Из уравнения (2) следует, что для расчетов необходимо знать концентрации свободного и связанного с антителами антигена в условиях равновесия. Обычно для этого используют антигены, меченные маркером, который с высокой чувствительностью может быть определен одним из доступных физико-химических методов.

Перечень экспериментальных методов определения аффинности взаимодействия антигена с антителом приведен в табл. 2.4.

Все методы, позволяющие определять концентрации свободного и связанного антигена, можно условно разбить на две большие группы.

К **первой группе** относятся методы, в которых стадия разделения свободного и связанного антигена осуществляется путем избирательного осаждения, аффинного связывания или гель-фильтрации. Если реагенты достаточно сильно различаются своими молекулярными массами и размерами, то процедура

Таблица 2.4

Методы определения аффинности антител

Метод	Используемые антигены
Равновесный диализ	Гаптены, диализуемые антигены
Осаждение глобулиновой фракции сульфатом аммония	Гаптены; антигены, растворимые при 50 % насыщении сульфатом аммония
Осаждение углем, модифицированным декстраном	Гаптены
Осаждение антиглобулинами	Гаптены, белки, полисахариды
Гель-фильтрация, разделение по молекулярной массе	Гаптены, белковые полисахариды
Тушение флуоресценции	Гаптены и антигены со специфическими флуоресцентными свойствами
Усиление флуоресценции	Гаптены, белки
Поляризация флуоресценции	Гаптены, белки
Спектральные методы	Гаптены, связанные с красителем
Тушение биолюминесценции	Гаптены, белки

разделения существенно упрощается. В случае корпускулярных антигенов оставшиеся несвязанными антитела могут быть отделены либо центрифугированием, либо пропусканием смеси через фильтр, задерживающий антиген. Для низкомолекулярных антигенов используется равновесный диализ.

Методы фракционного осаждения используются для разделения комплексов «антиген — антитело» и несвязавшегося антигена. Они основаны на способности высокомолекулярных комплексов «антиген — антитело» избирательно осаждаться различными реагентами. При установлении в системе равновесия осаждающий реагент добавляют в такой концентрации, при которой комплекс «антиген — антитело» и несвязавшиеся антитела становятся нерастворимыми и выпадают в осадок, который легко может быть удален центрифугированием.

Методы, не включающие фазовое разделение вступившего и не вступившего в реакцию антигена, относятся к гомогенным методам.

Вторая группа включает методы, базирующиеся на изменении физико-химических свойств антигенов при комплексообразовании с антителами: тушении или усилении флуоресценции, изменении степени поляризации флуоресценции, ферментативной активности.

Флуоресцентные методы основаны на способности остатков триптофана в молекулах белков флуоресцировать при возбуждении УФ-светом. Взаимодействие ряда антигенов с антителами приводит к изменению интенсивности

флуоресценции, что может быть использовано для оценки количества антигена, вступившего в реакцию с антителами. В зависимости от химической структуры антигена может наблюдаться как усиление, так и гашение флуоресценции. Степень гашения интенсивности свечения зависит от концентрации активных центров антител, константы их ассоциации с антигеном и пропорциональна концентрации образовавшихся специфических комплексов. Методы флуоресценции просты, не занимают много времени и имеют высокую чувствительность, что сокращает расход реагентов.

Методы деполяризации флуоресценции основаны на измерении поляризации флуоресценции антигена, меченного красителем, до взаимодействия с антителами и после комплексообразования. Поляризация флуоресценции определяется молекулярным объемом частицы и степенью ее асимметрии. Комплексообразование антигена с антителом сопровождается резким изменением поляризации флуоресценции красителя, который играет роль метки антигена или антитела. Предел обнаружения антигена этими методами достаточно мал. Недостатками методов, основанных на измерении флуоресценции, являются необходимость работы с препаратами очищенных антител и строгие требования к структуре изучаемых антигенов. Вследствие этого флуоресцентные методы не являются универсальными и могут быть применены для ограниченной группы антигенов.

Метод тушения биолюминесценции основан на использовании в качестве маркера АТФ, пришитой к молекуле антигена. В составе такого комплекса молекула АТФ сохраняет активность в реакции биолюминесценции, катализируемой светлячковой люциферазой. При добавлении антител образуется комплекс с антигеном, в котором молекула АТФ становится недоступной ферменту, в результате чего ингибируется реакция биолюминесценции. Указанный метод обладает высокой чувствительностью.

Расчет аффинности

Для расчета аффинности используют также графический подход с применением координат Скэтчарда (рис. 2.2). При этом по оси абсцисс откладывают концентрацию связанного антигена, а по оси ординат — отношение концентрации связанного антигена к концентрации свободного антигена. Получаемые зависимости имеют линейный вид, если тестируются моноклональные антитела и моновалентный антиген (см. рис. 2.2, а).

Уравнение Скэтчарда может быть выведено из уравнения (2). Из уравнения (2) следует, что для расчета K_{acc} необходимо знать три величины: концентрации комплекса «антиген — антитело», свободных антител и антигена. При равновесном диализе, когда общее содержание антител остается неизменным, практически измеряют только два параметра: концентрацию связанного ан-

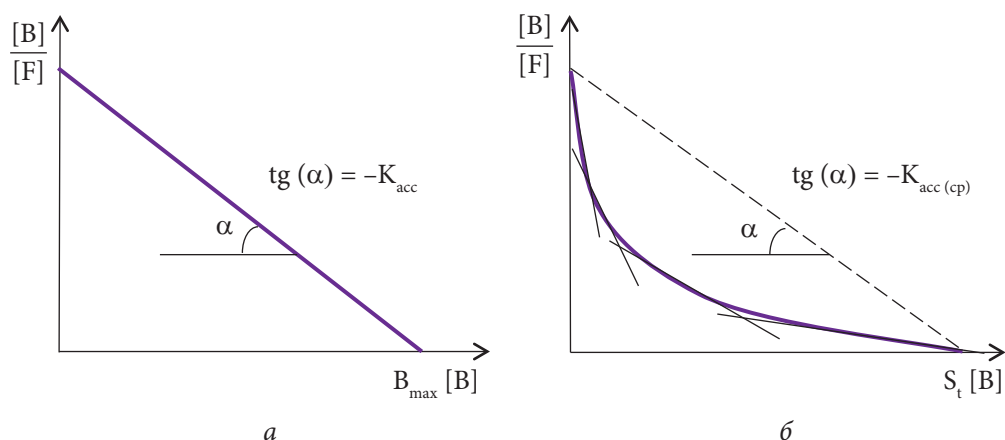


Рис. 2.2. График Скэтчарда, позволяющий рассчитать константу аффинности для моноклональных (а) и поликлональных (б) антител

тигена и концентрацию свободного антигена. Тогда молярная концентрация комплекса «антиген — антитело» ($[Ag - At]$) равна концентрации связанного антигена, которая обычно обозначается как B (от англ. *bond* — связанный). Концентрация свободного антигена $[Ag]$ обозначается буквой F (от англ. *free* — свободный).

Учитывая, что концентрация антител $[At]$ соответствует не концентрации цельных антител, а концентрации их антигенсвязывающих участков (или Fab-фрагментов), которая обозначается как S (от англ. *site* — сайт, связанный участок), она может быть выражена через концентрацию связанного антигена: $S = S_t - B$, где S_t — общая (от англ. *total* — полный, суммарный) концентрация (связанных и свободных) антигенсвязывающих участков.

В результате выполненных допущений уравнение (2) преобразуется в уравнение Скэтчарда:

$$K_{acc} = \frac{[B]}{[F] \cdot [S_t - B]},$$

где $[B]$ — концентрация связанного антигена; $[F]$ — концентрация свободного антигена; $[S_t]$ — общая концентрация (связанных и свободных) антигенсвязывающих сайтов.

В уравнении Скэтчарда константа аффинности (K_{acc}) равна отношению $[B]/[F]$ к $[S_t - B]$. Однако на графике Скэтчарда по оси абсцисс откладывается не $[S_t - B]$, а $[B]$ (см. рис. 2.2). То, что абсолютное значение K_{acc} при этом не меняется, вытекает из того, что S_t в конкретном эксперименте является величиной постоянной, а S и B жестко связаны между собой и находятся в рамках S_t . Замена параметра $[S_t - B]$ на $[B]$ в графике Скэтчарда дает возможность рассчитать аф-

финность связи «антиген — антитело» на основе двух параметров, получаемых при равновесном диализе: молярных концентраций свободного и связанного антигена. K_{acc} имеет размерность л/моль или M^{-1} .

При взаимодействии моноклонального антитела с моновалентным антигеном, характеризующимся одной константой равновесия, график Скэтчарда имеет линейный вид: тангенс угла наклона α численно равен величине K_{acc} , взятой с противоположным знаком, а точка пересечения с осью абсцисс есть концентрация связанного антигена (см. рис. 2.2, а).

При оценке аффинности поликлональных антител график Скэтчарда характеризуется набором многих прямых линий и принимает вид вогнутой кривой (см. рис. 2.2, б). Крутой участок кривой отражает наличие антител с высокой аффинностью, а пологий — с низкой. Расчетным путем получают усредненное значение $K_{acc(ср)}$ всех входящих в систему антител.

2.2. Аффинность и авидность

Как упоминалось ранее, внутренняя константа ассоциации, характеризующая связь антитела с антигенным эпитопом или гаптенем, определяется как аффинность (сродство). Если антиген состоит из множества повторяющихся идентичных эпитопов или поливалентен, взаимодействие между полной молекулой антигена и антителом зависит не только от аффинности каждого эпитопа и соответствующего антитела, но и от суммарной аффинности всех вовлеченных эпитопов. Например, аффинность соединения анти-А-антитела с поливалентным антигеном А может быть на четыре-пять порядков выше, чем аффинность связи того же антитела (то есть анти-А-антитела) с моновалентным антигеном А. Причина в том, что соединение в пары анти-А-антител с антигеном А усиливается за счет увеличения числа участков антигена А, с которыми могут реагировать анти-А-антитела.

Термин «аффинность» обозначает внутреннюю ассоциативную константу между антителом и моновалентным лигандом, таким как гаптен, а термин «авидность» используется для обозначения общей связующей силы между антителами и поливалентным антигеном. Так, как правило, антитела IgM обладают большей авидностью, чем антитела IgG, хотя соединение каждого Fab-фрагмента молекулы IgM с лигандом может иметь такую же аффинность, что и у Fab-фрагмента молекулы IgG.

Активность участия иммуноглобулинов классов G, M и A в иммунологических реакциях отражена в табл. 2.5.

Таблица 2.5

**Активность антител, относящихся к различным классам иммуноглобулинов,
в иммунологических реакциях**

Реакция	IgG	IgM	IgA
Агглютинация	+	++	+
Преципитация	+	+	+
Связывание комплемента	++	+	–
Реакция Артюса	+	+	–
Лизис:	+	++	+
с участием комплемента			
с участием лизоцима и комплемента	–	–	+
Нейтрализация:			
вирусов	+	+	+
токсинов	+	–	+
Реакция с фагоцитами:			
клиренс (очистка от возбудителя)	+	++	Нет свед.
фагоцитоз (поглощение)	++	+	Нет свед.

Так, например, в реакциях агглютинации наиболее активны антитела, относящиеся к IgM и IgG, в реакции связывания комплемента участвуют главным образом антитела IgG и IgM, в реакции лизиса с участием лизоцима и комплемента — только IgA.

3. МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

3.1. Методы без использования меток (меченых реагентов)

3.1.1. Реакция преципитации

Реакция преципитации — это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом.

Компоненты реакции:

- растворимый антиген или гаптен (преципитиноген);
- антитела-преципитины (иммунная преципитирующая сыворотка);
- среда (изотонический раствор хлорида натрия или агаровый гель).

Антигенами для реакции преципитации служат растворимые соединения, величина частичек которых приближается к размерам молекул. Это могут быть белки, комплексы белков с углеводами и липидами, бактериальные экстракты, различные лизаты или фильтраты бульонных культур микробов. Антитела, участвующие в реакции преципитации, как правило, получают иммунизацией кроликов соответствующими антигенами. Оптимальное специфическое взаимодействие антитела с антигеном происходит в изотоническом растворе с рН, близким к нейтральному.

Реакция преципитации высокоспецифична и чувствительна, она позволяет быстро (в течение нескольких секунд) выявлять незначительные количества антигена вплоть до таких малых количеств, которые не обнаруживаются химическим путем.

Осаждение из раствора комплексов $Ag - At$ происходит в диапазоне эквивалентных соотношений концентраций взаимодействующих молекул. В случае большого избытка одного из реагентов образуется растворимый комплекс, и феномен реакции не проявляется. Поскольку преципитиноген имеет ультрамикроскопическое строение и его концентрация в единице объема выше, чем концентрация антител в таком же объеме сыворотки, для осаждения более легких частичек антигенов с образованием видимого преципитата необходимо значительно большее количество антител, поэтому диагностические преципитирующие сыворотки выпускают с высоким титром последних.

Феномен преципитации связан с образованием решетчатых структур благодаря поливалентной природе антигенов и антител. Теория «решетки» наиболее четко была сформулирована впервые Дж. Р. Марраком (J. R. Marrak). В соответствии с этой теорией к образовавшемуся комплексу «антиген — антитело» последовательно присоединяются другие молекулы антител и антигенов. В результате формируются сетевые структуры, которые превращаются в агрегаты, выпадающие в осадок. Характер и выраженность реакции зависят от количественного соотношения антигенов и антител. Наиболее интенсивно реакции проявляются в том случае, когда реагенты находятся в эквивалентном соотношении. К числу фактов, подтверждающих эту теорию, можно отнести следующие:

1) одновалентные гаптены не дают реакции преципитации, при наличии в молекуле двух и более эпитопов преципитат в присутствии антител, как правило, образуется;

2) полученные в результате расщепления молекулы антител одновалентные Fab-фрагменты не преципитируют поливалентный антиген, хотя и соединяются с ним;

3) двухвалентные гаптены, содержащие две различные по структуре детерминантные группы, способны образовывать преципитат лишь в присутствии антител, специфичных к обоим детерминантным группам.

Прямые доказательства образования решетчатых структур при формировании преципитата были получены с помощью электронной микроскопии. Схематически эти структуры представлены на рис. 3.1.

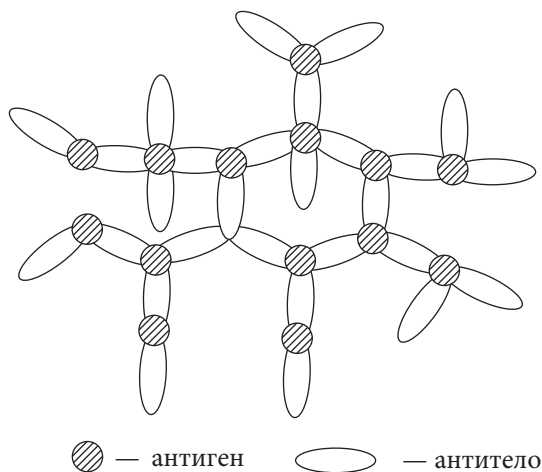


Рис. 3.1. Схематическая структура преципитата

Молекулы антигена являются узлами решетки, а молекулы антител — связующими звеньями.

Реакцию преципитации можно проводить и в жидкой, и в твердой среде. Широкое распространение получили реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы: радиальная иммунодиффузия по Манчини, двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, иммуноэлектрофорез.

3.1.1.1. Реакция кольца преципитации

Обязательным условием постановки реакции преципитации в жидкой среде является максимальная прозрачность иммунореагентов. Реакция происходит при наложении раствора одного иммунореагента на другой. По характеру образовавшегося преципитата (в виде кольца) реакция получила название кольца преципитации.

Постановка реакции. Узкую (диаметром 0,5 см) пробирку с неразведенной преципитирующей сывороткой в объеме 0,3–0,5 мл удерживают в наклонном положении и пастеровской пипеткой медленно, по стенке, наслаивают антиген в таком же объеме. Пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наложении преципитиногена на сыворотку четко обозначается граница между двумя слоями жидкости. Постановка реакции обязательно сопровождается контролями сыворотки и антигена.

Учет. Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител через 5–10 мин, 1–2 ч или через 20–24 ч. В случае положительной реакции в пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется преципитат в виде кольца белого цвета.

Если в качестве антигена в реакции кольца преципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей, то такая реакция называется реакцией термопреципитации (пример — реакция Асколи, которая в ветеринарной практике применяется для обнаружения возбудителя сибирской язвы в кожевенном и прочем сырье).

Реакция кольца преципитации также используется для изучения антигенной структуры бактерий, сложных белков, жидкостей человека и животных; для изучения токсигенности бактерий; при диагностике ряда инфекционных заболеваний бактериальной, вирусной, грибковой природы (сибирской язвы, чумы, туляремии и т. д.). В качестве антигена используют раневые экссудаты, фильтраты экстрактов пораженных органов, спинно-мозговую жидкость и т. д. Для установления степени родства видов микроорганизмов определяют общий антиген. В судебно-медицинской практике с помощью реакции кольца преципитации определяют видовую принадлежность белков (крови, слюны, спермы и пр.) и выявляют примеси в мясных, рыбных, мучных изделиях.

3.1.1.2. Реакция преципитации в геле

Реакция преципитации в агаровом геле, или метод диффузионной преципитации, позволяет детально изучить состав сложных водорастворимых антигенных смесей. Для постановки реакции используют гель (полужидкий или более густой агар). Компоненты, входящие в состав антигена, диффундируют навстречу соответствующим антителам с разными скоростями, поэтому комплексы различных антигенов и соответствующих антител располагаются в разных участках геля, где и образуются линии преципитации. Каждая линия соответствует только одному комплексу «антиген — антитело». Реакцию преципитации ставят обычно при комнатной температуре.

Для количественного определения антигена часто используют **простую радиальную иммунодиффузию по Манчини**.

Моноспецифическую антисыворотку (источник антител) смешивают с агаровым гелем, затем полученную смесь наносят на предметные стекла и оставляют для застывания. В застывшем геле вырезают лунки, вносят в них раствор антигена в различных концентрациях и оставляют не менее чем на 24 ч. Антиген диффундирует в гель, связывается с антителами, и при достижении точки эквивалентности происходит осаждение комплексов $Ag - At$ в виде кольца. В стандартных условиях опыта диаметр кольца преципитации прямо пропорционален концентрации исследуемого антигена. Таким способом получают калибровочную кривую, с помощью которой можно количественно определить исследуемый антиген (рис. 3.2).

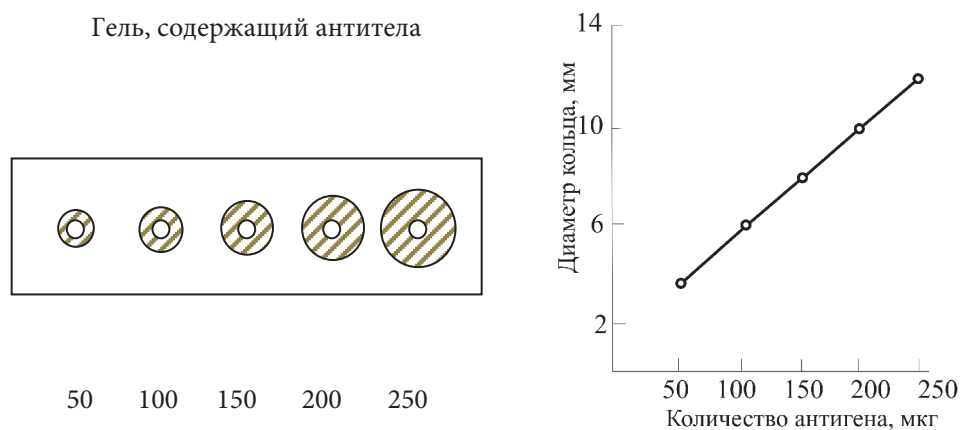


Рис. 3.2. Построение калибровочного графика для количественного определения антигена в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини

Для количественного определения антител применяют этот же метод в обратной последовательности: в гель добавляют антиген, а в лунки — антитела.

Чаще всего при помощи этого метода определяют белковые антигены: количественное содержание иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови и других жидкостях, в секретах желез, белках крови, спинно-мозговой жидкости и т. д.

Реакция Оухтерлони (реакция двойной иммунодиффузии) — метод идентификации антигенов или антител на основании образования преципитата в результате миграции обоих иммунореагентов навстречу друг другу в слое агара.

Постановка. Для постановки реакции используют агар или специально приготовленный предельно осветленный гель из агар-агара. В агаре, разлитом тонким слоем в чашки или на предметное стекло, при помощи специальных штампов или стеклянных трубок с ровными краями вырезают лунки на равном расстоянии друг от друга (4–10 мм) для антигена и антисыворотки и заполняют их соответствующими растворами. Антиген и антитела диффундируют в гель навстречу друг другу, взаимодействуют и образуют преципитат в виде тонких белесоватых линий.

Поскольку диффузия реагентов из лунок в гель происходит одновременно и радиально, это позволяет анализировать сразу несколько образцов иммунореагентов, разместив вокруг лунки с антисывороткой несколько лунок с растворами разных антигенов; или, наоборот, заполняя периферические лунки антисывороткой, а центральную — искомым антигеном; или в центральную лунку вносят известный антиген, а в периферические — исследуемую сыворотку в разных разведениях.

При наличии антигенной специфичности в определенной периферической лунке формируется полоса преципитации между нею и центральной лункой. Таким образом, с помощью известной антисыворотки можно идентифицировать неизвестный антиген или наоборот.

Двойную радиальную иммунодиффузию применяют главным образом для качественного анализа, например для определения числа антигенов в различных жидкостях (в сыворотке крови, цереброспинальной жидкости), для оценки чистоты препаратов при выделении антигена, для сравнения известных антигенов и антител с неизвестными, а также с целью наблюдения за ходом иммунизации животных.

Оценка результатов. При оптимальном соотношении Аг и Ат линия преципитации располагается почти посередине между лунками. Количественное преобладание одного из реагентов сдвигает линию преципитации к лунке другого реагента. Антиген и антитела образуют видимые преципитаты при концентрациях белка от 5 до 50 мкг/мл. При оценке результатов иммунодиффузии учитывают: расстояние, отделяющее линию преципитации от центральной и периферической лунок; интенсивность и ширину полос преципитации; последнее разведение антисыворотки, при котором еще можно видеть преципитат.

Сравнительный анализ. Для выявления полной или частичной идентичности антигенов в геле обычно вырезают три лунки, расположенные треугольником. В две из них помещают сравниваемые растворы антигенов, а в третью — антисыворотку. Принципиально возможны три варианта расположения линий преципитации (рис. 3.3).

1. Обе линии полностью сливаются. Это говорит об идентичности антигенов в обеих лунках (см. рис. 3.3, а).

2. Одна из линий длиннее другой и, выходя из последней, образует так называемую шпору (см. рис. 3.3, б). Шпора часто бывает тоньше, чем основные линии преципитации. Вторая линия сливается с линией, образовавшей шпору. В данном случае это свидетельствует о частичной идентичности антигенов. Оба антигена имеют некоторые общие детерминанты, которые, соединяясь с антителами, дают сливающиеся линии преципитации. Однако у первого антигена имеются еще и детерминанты, которых нет у второго.

3. Линии пересекаются либо не сливаются и не пересекаются. Это указывает на неидентичность антигенных детерминант и, следовательно, на различие молекул исследуемых антигенов (см. рис. 3.3, в).

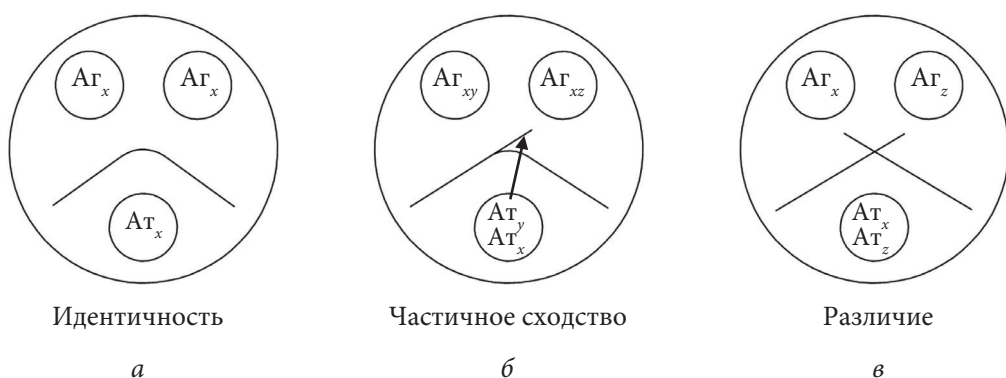


Рис. 3.3. Идентификация антигенов или антител с помощью реакции Оухтерлони (реакции двойной иммунодиффузии)

3.1.1.3. Реакция флоккуляции

Реакция флоккуляции — это частный случай реакции преципитации. Реакцией флоккуляции (от лат. *floccus* — хлопья шерсти) называется появление опалесценции или хлопьевидной массы при добавлении в пробирку с токсином (анатоксином) антитоксической сыворотки. Данную реакцию обычно применяют для определения активности антитоксической сыворотки (количества международных единиц — МЕ в 1 мл сыворотки).

Принцип реакции: к серийным разведениям антитоксической сыворотки добавляют одинаковое количество антигенных единиц (АЕ) токсина или ана-

токсина. Одна АЕ — это такое количество токсина или анатоксина, которое связывается одной МЕ антитоксической сыворотки.

Первичная (инициальная) флоккуляция наступает в пробирке, где антиген и антитела находятся в эквивалентных количествах (рис. 3.4).

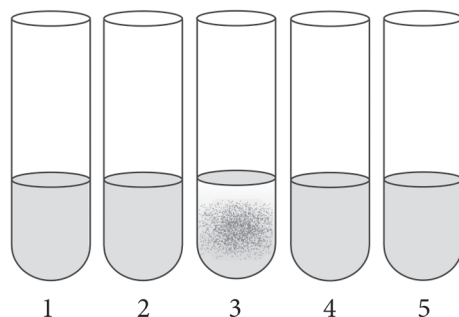


Рис. 3.4. Первичная флоккуляция в пробирке 3

Зная количественный состав ингредиентов в пробирке, где произошла инициальная флоккуляция, можно рассчитать активность антитоксической сыворотки. Например, инициальная флоккуляция наступила в пробирке, где находятся 0,02 мл сыворотки и 4 антигенные единицы токсина или анатоксина. Следовательно, 0,02 мл данной сыворотки содержит 4 МЕ токсина или анатоксина. Составив пропорцию, можно определить титр антитоксической сыворотки:

$$\begin{aligned} 0,02 \text{ мл} &- 4 \text{ МЕ}, \\ 1 \text{ мл} &- x \text{ МЕ}, \end{aligned}$$

получаем $x = (1 \times 4) : 0,02 = 200 \text{ МЕ}$.

3.1.2. Реакция агглютинации

Реакция агглютинации — одна из первых иммунологических реакций в микробиологической практике. Впервые эту реакцию для диагностики брюшного тифа применил Ф. Видаль в 1895 г.

Суть реакции агглютинации (от лат. *agglutinatio* — склеивание) — в «склеивании» корпускулярных антигенов антителами в присутствии электролита — хлорида натрия. Корпускулярными антигенами могут являться бактерии, эритроциты или другие клетки, нерастворимые частицы с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярные агрегаты. Проявляется реакция агглютинации образованием хлопьев или осадка (клеток, «склеенных» антителами, имеющими два антигенсвязывающих центра или более).

Антиген, участвующий в реакции агглютинации, называется агглютиногеном, антитело — агглютинином, образующийся осадок — агглютинатом.

В реакции агглютинации участвуют главным образом антитела, относящиеся к иммуноглобулинам классов G и M. Реакция агглютинации — двухстадийная. Первая стадия заключается в специфическом взаимодействии активного центра антител с детерминантой антигена, это может происходить в отсутствие электролитов и не сопровождается видимыми изменениями реагирующей системы. Для реализации второй стадии — образования агглютината — необходимо наличие электролитов, которые снижают электрический заряд комплексов $Ag - At$ и ускоряют процесс их «склеивания». Заканчивается вторая стадия образованием агглютината. При образовании агглютината имеет значение количественное соотношение антигена и антител (феномен оптимума). При избытке или недостатке антител агглютинация задерживается.

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител. Например, реакция агглютинации с О-диагностикумом (бактериями, убитыми нагреванием и сохранившими термостабильный О-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации. Реакция агглютинации с Н-диагностикумом (бактериями, убитыми формалином и сохранившими термолабильный жгутиковый Н-антиген) — крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Разработано несколько вариантов реакции агглютинации, различающихся по методическому исполнению и цели исследования.

Ориентировочная реакция агглютинации предназначена для идентификации микробного вида с использованием известной иммунной агглютинирующей сыворотки и для экспресс-выявления антител в сыворотке крови с применением известного микробного диагностикума.

Если необходимо *идентифицировать возбудитель*, то применяют диагностические антитела (агглютинирующую сыворотку). Для идентификации микроорганизма на обезжиренное предметное стекло наносят отдельно каплю известной агглютинирующей сыворотки в разведении 1 : 10 или 1 : 20 и каплю физиологического раствора (контроль). Затем к каждой капле добавляют чистую культуру исследуемого микроорганизма и суспендируют до получения гомогенной взвеси (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Ориентировочные реакции агглютинации:
физиологический раствор + культура микроорганизмов (а);
сыворотка крови (1 : 100) + культура микроорганизмов (б)

Результат учитывают через 2–4 мин. В контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При положительной реакции (специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке) в капле сыворотки появляются хлопья агглютината, хорошо видимые на темном фоне при покачивании предметного стекла. В случае отрицательной реакции жидкость остается равномерно мутной. Отсутствие феномена агглютинации свидетельствует о том, что исследуемая культура микроорганизма не соответствует иммунной сыворотке. Несомненными достоинствами реакции агглютинации на стекле являются простота ее постановки и то, что она протекает несколько минут или даже секунд, так как оба компонента в ней используются в концентрированном виде. Однако реакция агглютинации на стекле имеет лишь качественное значение.

Стандартные диагностические агглютинирующие сыворотки получают гипериммунизацией лабораторных животных взвесью бактерий. Титром такой сыворотки является ее наибольшее разведение, при котором наблюдается отчетливая агглютинация соответствующего антигена.

Если у разных бактерий имеются одинаковые или сходные групповые антигены, они могут агглютинироваться одной и той же диагностической сывороткой, что затрудняет их идентификацию. В этих случаях пользуются адсорбированными агглютинирующими сыворотками, из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем их адсорбции родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данным бактериям.

Для получения указанных сывороток применяют метод Кастеллиани, который состоит в том, что при насыщении агглютинирующей сыворотки родственными гетерогенными бактериями происходит адсорбция групповых антител, а специфические антитела остаются в сыворотке. В зависимости от полноты истощения групповых агглютининов можно получить монорецепторные сыворотки, то есть сыворотки, имеющие антитела только к одному рецептору-антигену, или адсорбированные поливалентные сыворотки, дающие реакции агглютинации с двумя-тремя родственными бактериями, имеющими общий антиген, в отношении которого проводилась адсорбция.

Для *экспресс-определения антител в сыворотке крови* с помощью реакции агглютинации используют стандартный микробный диагностикум, содержащий взвесь известных микробов или их антигенов. Реакция агглютинации хорошо выявляет IgM-антитела, но менее чувствительна для определения IgG-антител.

Для количественного определения антител в сыворотке крови применяется **развернутая реакция агглютинации**. Вначале готовят двухкратные разведения исследуемой сыворотки крови изотоническим раствором хлорида натрия в пропорции от 1 : 50 до 1 : 1 600. В качестве антигена в этой реакции используют диагностикумы — взвеси известных (как правило, убитых) бактерий.

В полученные двухкратные разведения сывороток вносят по 1–2 капли взвеси бактерий. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 2 ч.

Реакция протекает с образованием мелких хлопьев, не обнаруживаемых невооруженным глазом, поэтому полученные результаты оценивают под небольшим увеличением в специальном приборе — агглютиноскопе. Учет проводят только при условии, что контроль сыворотки — прозрачный, контроль антигена — мутный (рис. 3.6).

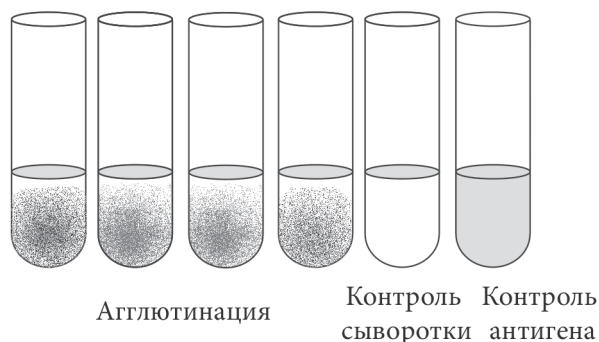


Рис. 3.6. Развернутая реакция агглютинации

Интенсивность агглютинации оценивают по системе «четыре плюса»: полная агглютинация — 4+, частичная — 3+ или 2+, сомнительный результат — 1+. За титр антител в исследуемой сыворотке принимают последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация 2+.

Если развернутая реакция агглютинации ставится для сероидентификации, то используют агглютинирующие диагностические сыворотки, разведенные до титра или до половины их титра. Реакция считается положительной, если агглютинация обнаруживается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки.

Реакция прямой гемагглютинации. Гемагглютинация (от греч. *haima* — кровь + от лат. *agglutinatio* — склеивание) — феномен склеивания эритроцитов. Реакция называется прямой, так как антитела (агглютинины) непосредственно агглютинируют корпускулярные антигены (агглютиногены). Реакция прямой гемагглютинации применяется для определения групповой принадлежности крови по системе АВ0 и резус-фактора.

Для определения групп крови с помощью реакции прямой гемагглютинации используют стандартные изогемагглютинирующие сыворотки крови доноров: 0 (I), А (II), В (III). Реакции ставят на стекле или в лунках специального планшета. Положительная реакция агглютинации может быть пескообразной или лепестковой. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет. Принадлежность исследуемой крови к соответствующей

группе определяют по наличию или отсутствию агглютинации при реакции с соответствующими сыворотками после наблюдения в течение 5 мин.

Если сыворотки всех трех групп дали положительную реакцию, это указывает на то, что исследуемая кровь принадлежит к группе АВ (IV). Для исключения неспецифической реакции агглютинации проводят дополнительное контрольное исследование испытуемой крови со стандартной сывороткой группы АВ (IV), не содержащей агглютининов. Лишь отсутствие агглютинации в этой капле при наличии агглютинации в каплях, содержащих стандартные сыворотки групп 0 (I), А (II) и В (III), позволяет считать реакцию специфической и отнести исследуемую кровь к группе АВ (IV).

Применяется также проба на совместимость крови, когда капли крови донора и реципиента в соотношении 1 : 10 смешивают и оценивают агглютинацию.

Наиболее современным методом определения группы крови и резус-фактора является использование цоликлонов анти-А, анти-В и анти-D-супер, которые представляют собой мышинные моноклональные антитела, полученные с помощью гибридной технологии.

На специальный планшет наносят по одной большой капле (0,1 мл) цоликлонов анти-А и анти-В. Рядом с ними — по одной маленькой капле (0,01–0,03 мл) исследуемой крови. Цоликлон и кровь перемешивают и наблюдают за наступлением или отсутствием реакции агглютинации в течение 3 мин (рис. 3.7).

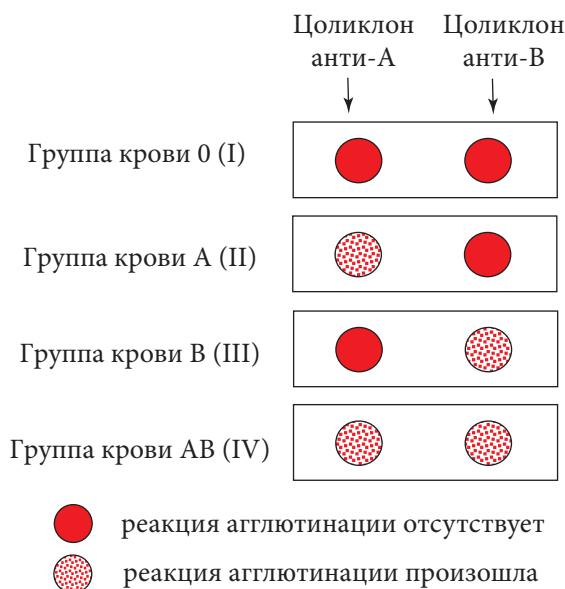


Рис. 3.7. Определение группы крови с использованием цоликлонов анти-А и анти-В

Если реакция агглютинации отсутствует и с анти-А, и с анти-В цоликлонами, то исследуемая кровь относится к группе 0 (I).

Если реакция агглютинации произошла с анти-А цоликлоном, то исследуемая кровь относится к группе А (II).

Если реакция агглютинации произошла с анти-В цоликлоном, то исследуемая кровь относится к группе В (III).

Если реакция агглютинации произошла и с анти-А, и с анти-В цоликлонами, то исследуемая кровь относится к группе АВ (IV).

Определение резус-фактора выполняется аналогично определению группы крови, то есть с помощью моноклонального антитела к резус-антигену (цоликлона анти-D). Если реакция агглютинации с цоликлоном анти-D произошла, то исследуемая кровь относится к резус-положительной — Rh(+), при отсутствии агглютинации кровь резус-отрицательная — Rh(-).

Общий с прямой гемагглютинацией механизм имеет *вирусная гемагглютинация*. Многие вирусы способны спонтанно агглютинировать эритроциты определенных видов млекопитающих и птиц; их добавление к суспензии эритроцитов вызывает образование агрегатов из них. Так, вирусы гриппа агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, человека, а аденовирусы — эритроциты крыс, мышей. Вирусы, обладающие гемагглютинирующими свойствами, имеют на поверхности гемагглютинины, с помощью которых происходит склеивание эритроцитов. По своей химической природе гемагглютинины являются глико- или липопротеидами.

Гемагглютинация, вызываемая вирусами, не относится к иммунологическим реакциям, так как здесь нет системы «антиген — антитело». С помощью этой реакции легко выявить присутствие гемагглютинирующего вируса, но невозможно его идентифицировать. Идентифицируют вирусы с помощью серологической реакции торможения гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) — серологическая реакция, основанная на способности антител предотвращать агглютинацию эритроцитов вирусами гемагглютинирующих видов.

Основана данная реакция на способности антител связывать различные вирусы и нейтрализовать их, лишая возможности агглютинировать эритроциты. Если предварительно соединить вирус со специфической иммунной вируснейтрализующей сывороткой и потом добавить эритроциты, то такой инактивированный вирус теряет способность вызывать гемагглютинацию. Эта реакция и получила название реакции торможения гемагглютинации. Она может быть использована для окончательной идентификации неизвестного гемагглютинирующего вируса (по специфической диагностической сыворотке), а также для выявления титра неизвестных антител в сыворотке (по известным вирусным антигенам-диагностикумам).

Применяют РТГА для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных (рис. 3.8).

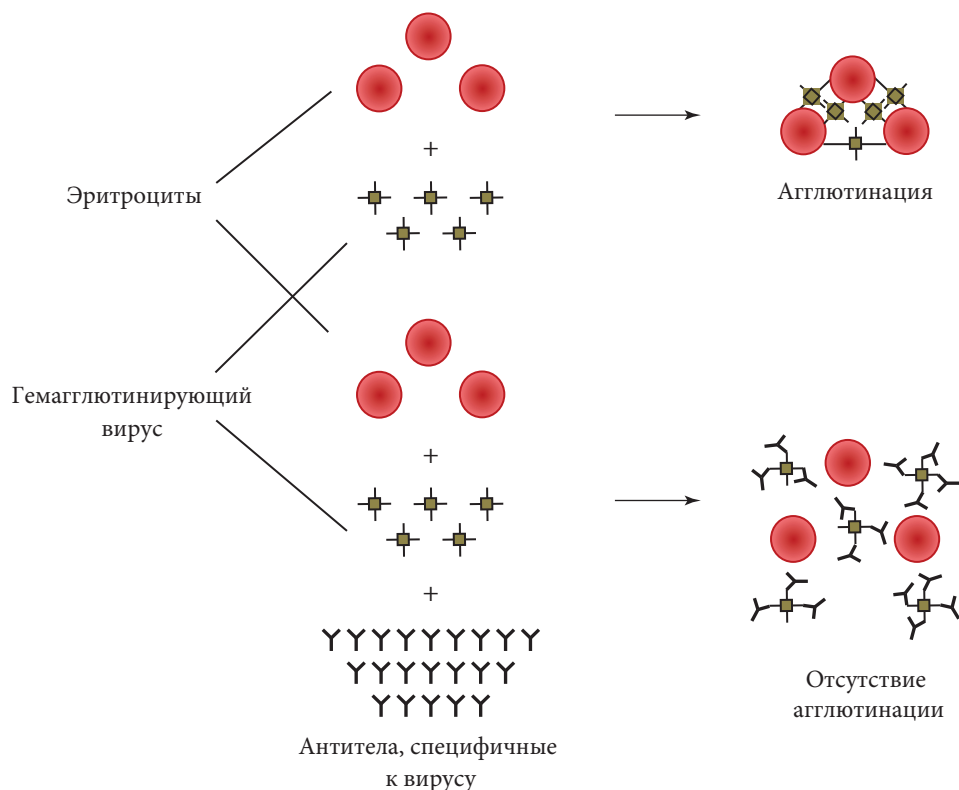


Рис. 3.8. Механизм реакции торможения гемагглютинации

























Для постановки РТГА используют заведомо известные иммунные противовирусные сыворотки, которые в двукратно снижающихся концентрациях разводят в изотоническом растворе натрия хлорида и разливают по лункам. К каждому их разведению добавляют одно и то же количество вирусосодержащей жидкости. Контролем является взвесь вируса в изотоническом растворе натрия хлорида. Планшеты со смесью сывороток и вируса выдерживают в термостате 30 мин или при комнатной температуре 2 ч, затем в каждую из них добавляют взвесь эритроцитов. Спустя 30 мин определяют титр вируснейтрализующей сыворотки (то есть максимальное ее разведение), вызвавшей задержку агглютинации эритроцитов.

Типирование вируса проводят в РТГА с набором типоспецифических сывороток. Результаты реакции учитывают по отсутствию гемагглютинации. В случае положительного результата эритроциты оседают на дне в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем («перевернутый зонтик»), при



отрицательном результате — располагаются в центре дна в виде «пуговики» или колечка. Например, подтипы вируса гриппа А с антигенами H_0N_1 , H_1N_1 , H_2N_2 , H_3N_2 и др. могут быть дифференцированы в РТГА с набором гомологичных типоспецифических сывороток (табл. 3.1).

Таблица 3.1

**Результаты реакции торможения гемагглютинации
при типировании вируса гриппа**

Типоспецифическая противогриппозная сыворотка	Разведение сыворотки					Контроль		
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	сыво- ротки	ви- руса	эритро- цитов
H_0N_1								
H_1N_1								
H_3N_2								

Примечания

1.  — торможение гемагглютинации («пуговка»);  — гемагглютинация («перевернутый зонтик»).

2. Вывод: исследуемый материал содержит вирус гриппа типа А с антигеном H_3N_2 .

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА или РПГА) включает предварительную обработку эритроцитов антигеном (или антителами). Такие эритроциты способны агглютинироваться, соответственно, иммунной сывороткой (или антигеном).

Это позволяет в отличие от классической реакции агглютинации использовать не только корпускулярные, но и растворимые антигены. В настоящее время наиболее часто применяют эритроциты животных или человека. Эритроциты, адсорбировавшие на себе антиген, называются сенсibilизированными данным антигеном, а иммунная реакция, в которой они участвуют, — реакцией непрямой, или пассивной, гемагглютинации, так как эритроциты участвуют в ней пассивно.

Сорбцией растворимых микробных антигенов на эритроцитах как носителях получают антигенный диагностикум. Антигенные диагностикумы применяют для обнаружения антител. Если на эритроцитах сорбированы антитела известной иммунной сыворотки, то это — антительный диагностикум. Антительные диагностикумы используют для обнаружения антигенов в исследуемом материале.

Реакция непрямой гемагглютинации отличается от реакции агглютинации значительно более высокой чувствительностью и специфичностью и ставится:

1) для обнаружения полисахаридов, белков, экстрактов бактерий и других высокодисперсных веществ, риккетсий и вирусов, комплексы которых с агглютинами в обычных реакциях агглютинации увидеть не удастся;

2) для выявления антител в сыворотках к этим высокодисперсным веществам и мельчайшим микроорганизмам.

В случае положительного результата эритроциты оседают на дне в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем («перевернутый зонтик»), при отрицательном результате — располагаются в центре дна в виде «пуговицы» или колечка (рис. 3.9).

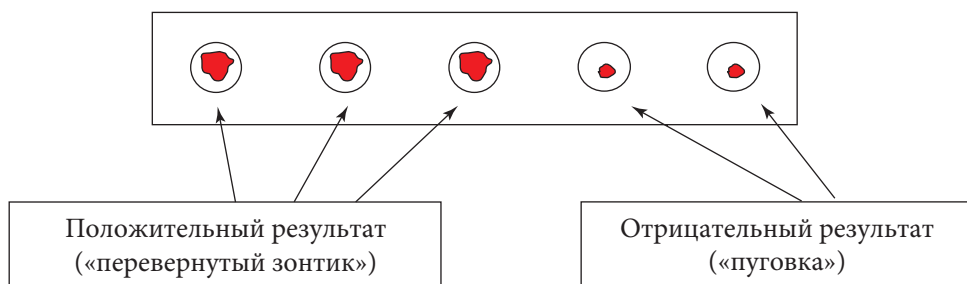


Рис. 3.9. Результаты реакции непрямой гемагглютинации







РНГА используют при серологической диагностике инфекций, вызванных бактериями, риккетсиями, простейшими; для определения гормона хорионического гонадотропина в моче при установлении беременности; для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам и в некоторых других случаях.

Пример. Возбудитель ботулизма *Clostridium botulinum* вырабатывает токсины семи типов, чаще других встречаются типы А, В, Е. Все типы токсинов различаются по антигенным свойствам и могут быть дифференцированы в реакциях типоспецифическими сыворотками. Для этой цели можно поставить реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации с сывороткой больного, в которой предполагается наличие токсина, и эритроцитами, нагруженными антителами антитоксических противоботулинических сывороток типов А, В, Е. Контролем служит нормальная сыворотка. Результаты исследования приведены в табл. 3.2.

Латекс-агглютинация является одним из видов реакции агглютинации, в которой в качестве носителя антигена или антитела используются не эритроциты, а синтетические полимерные частицы — латексы. Латекс-агглютинация, как и другие серологические реакции, ставится как для выявления неизвестного антигена в исследуемом материале, так и обнаружения антител к микробу — возбудителю в испытуемой сыворотке.

Таблица 3.2

**Результаты реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации
на выявление возбудителя ботулизма**

Ингредиент, мл	Лунка					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Исследуемая сыворотка	0,5	0,5	0,5			
Нормальная сыворотка	—	—	—	0,5	0,5	0,5
Диагностикум ботулини- ческий эритроцитарный антителный:						
тип А	0,1			0,1		
тип В		0,1			0,1	
тип Е			0,1			0,1
Инкубация при 37 °С в течение 1 ч						
Результат	—	—	+	—	—	—
Наблюдаемая картина						
Вывод	В сыворотке больного обнаружен ботулотоксин типа Е					

Для постановки реакции используют сенсibilизированные частицы полистиролового латекса диаметром 0,5–1,2 мкм, которые в присутствии гомологичного иммунореагента (антигена или антитела) склеиваются. Реакция происходит достаточно быстро, в течение 2–7 мин.

Для приготовления антигенного латексного диагностикума растворимые мелкодисперсные антигены бактериальной клетки белковой или полисахаридной природы адсорбируют на поверхности окрашенных частиц инертного монодисперсного латекса.

Нагруженные бактериальным антигеном латексные частицы склеиваются под действием иммунной сыворотки, содержащей антитела против данного антигена, что приводит к образованию характерного осадка — тонкой пленки с неровными краями («перевернутый зонтик»). Такую модификацию реакции латекс-агглютинации применяют для выявления противогриппозных, противокраснушных, противокоревых антител и др.

Нагруженные антителами частицы латекса широко используются для обнаружения антигенов вирусов и бактерий. Метод чувствителен и прост в техническом исполнении.

Реакция коагглютинации применяется для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка (антителный диагностикум) (рис. 3.10).

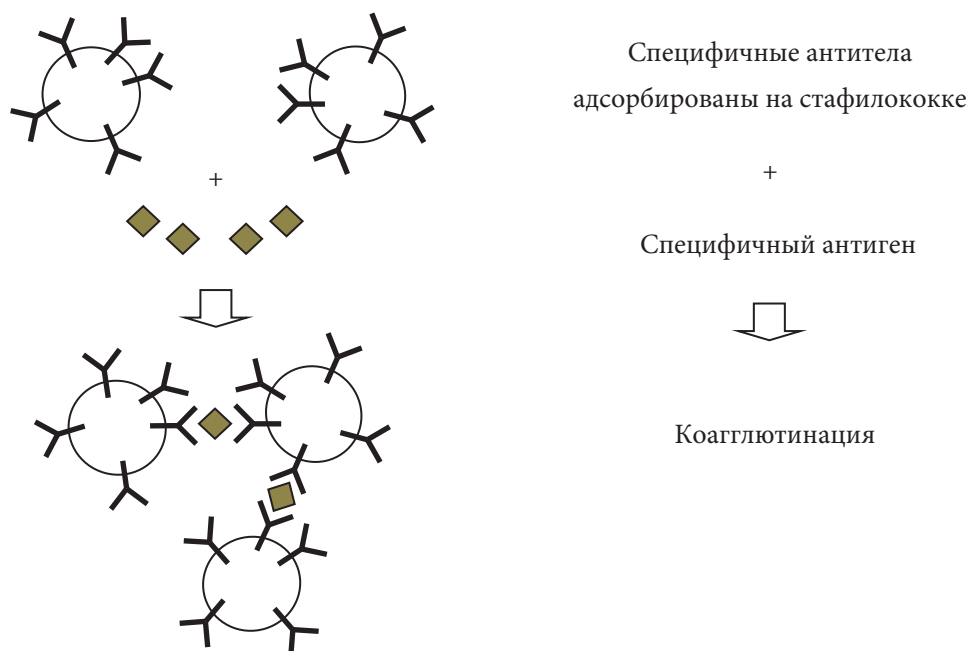


Рис. 3.10. Механизм реакции коагглютинации

Для постановки реакции коагглютинации используют золотистые стафилококки (штамм Cowan 1). В клеточной стенке этих бактерий содержится белок А, который имеет значительное сродство к Fc-фрагменту IgG человека и кролика. Поэтому молекулы IgG после адсорбции на стафилококках, которые имеют белок А, ориентированы в окружающую среду своими Fab-фрагментами, содержащими активные центры антител, которые затем взаимодействуют с антигенными детерминантами соответствующих микроорганизмов. В результате коагглютинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба.

Прямая и непрямая антииммуноглобулиновые реакции Кумбса используются для выявления «неполных» (неагглютинирующих) антител, образующихся при резус-конflikте, аутоиммунных заболеваниях, аллергических состояниях, некоторых инфекциях. Неполными (блокирующими) называют антитела, у которых функционирует только один активный центр, то есть они — одновалентны. Второй антиген-связывающий центр у таких иммуноглобулинов экранирован различными структурами либо обладает низкой авидностью.

Неполные антитела могут связывать эпитопы антигена, но не способны агрегировать последний, то есть функционально они дефектны. В то же время, связывая эпитопы антигена, неполные антитела препятствуют контакту с ними полных антител, поэтому их также называют блокирующими антителами.

Для выявления неполных антител предложена иммунологическая диагностическая реакция — проба Кумбса (антиглобулиновый тест). Название пробы связано с именем английского иммунолога Робина Кумбса, предложившего эту реакцию.

В пробе Кумбса используется антииммуноглобулиновая сыворотка, которую получают путем иммунизации кролика иммуноглобулинами человека. Такая сыворотка содержит полные (бивалентные) антитела к человеческому иммуноглобулину. Различают два варианта реакции Кумбса: реакцию прямую и реакцию непрямую.

Прямая реакция Кумбса представляет собой антиглобулиновый тест, который проводится для выявления неполных антител, прикрепившихся к поверхности эритроцитов.

Исследуемую кровь или выделенные из нее эритроциты смешивают с антииммуноглобулиновой сывороткой. Если на эритроцитах есть неполные антитела, то они взаимодействуют с антителами антиглобулиновой сыворотки, и эритроциты агглютинируются.

Положительная прямая реакция Кумбса служит основным диагностическим признаком при приобретенной аутоиммунной или медикаментозной гемолитической анемии и гемолитической анемии новорожденных.

У здорового человека в организме отсутствуют антитела к эритроцитам, и нормой считается отрицательная реакция Кумбса.

Непрямая реакция Кумбса применяется для выявления антиэритроцитарных антител, свободно циркулирующих в сыворотке крови.

Реакция проводится в два этапа:

— на первом этапе к сыворотке крови добавляют отмытые эритроциты донора 0 (I) группы крови. Смесь инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. За это время происходит адсорбция неполных антител из сыворотки на нормальных эритроцитах. Далее эритроциты отмывают (помимо эритроцитов можно использовать бактериальные клетки, риккетсии);

— на втором этапе сенсibilизированные эритроциты смешивают с антииммуноглобулиновой сывороткой; молекула антиглобулина соединяет две молекулы неполных антител, фиксированных на разных эритроцитах, и наступает реакция агглютинации эритроцитов, которая наблюдается уже через 10 мин, по ней можно судить о наличии в исследуемой сыворотке неполных антител.

Непрямая реакция Кумбса применяется при переливании крови для определения того, совпадает ли кровь донора с кровью реципиента, и называется пробой на совместимость. Проба на совместимость помогает предотвратить любую неблагоприятную реакцию на кровь донора. Благодаря непрямой реакции Кумбса удается диагностировать присутствие антител к резус-фактору в крови женщин во время беременности.

3.1.3. Иммуноэлектрофорез

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) представляет собой сочетание электрофореза в агаровом геле с иммунодиффузией. Впервые ИЭФ описали П. Грабар и К. Уильямс в 1953 г.

Принцип иммуноэлектрофореза состоит в следующем: вначале проводят электрофоретическое разделение белковых антигенов в забуференном геле агара; после снятия напряжения вдоль направления движения белков в электрическом поле в геле вырезают канавку, в которую вносят преципитирующую иммунную сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и на месте их взаимодействия возникают дугообразные линии преципитации, число, положение и форма которых дают представление о составе исходной смеси антигенов (рис. 3.11).

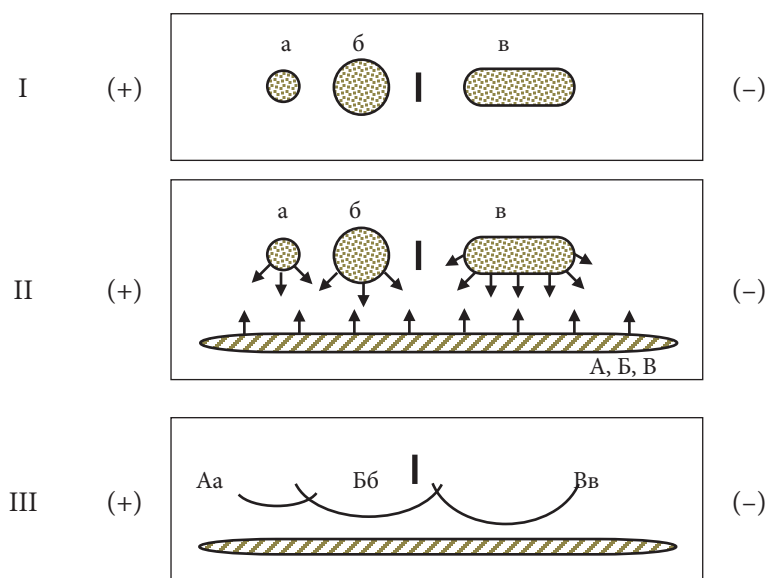


Рис. 3.11. Принцип проведения иммуноэлектрофореза:

I — электрофорез смеси антигенов в агаровом геле; II — вырезание в геле канавки параллельно оси разделения антигенов и заполнение ее антисывороткой, содержащей антитела (А, Б, В); антигены и антитела диффундируют в геле навстречу друг другу; III — образование дуг преципитации, соответствующих различным парам Аг — Ат (Аа, Бб, Вв)

Результаты иммуноэлектрофореза зависят от факторов, действующих как во время электрофореза, так и на этапе иммунодиффузии. Повышение разрешающей способности электрофореза приводит к улучшению разделения полос преципитации. На иммунодиффузию влияют специфичность и титр используемой антисыворотки, а также концентрация антигенов и геометрическое расположение в геле лунок для антигенов и канавок для антител.

После завершения иммунодиффузии иммуноэлектрофореграмму можно сразу же сфотографировать без всякой обработки геля, причем лучше в рассеянном свете (при темнопольном освещении). Кроме того, линии преципитации можно визуализировать каким-либо белковым красителем. Перед окрашиванием непрореагировавшие белки необходимо отмыть солевым раствором. Для этого слои геля вымачивают в течение 24–48 ч в солевом растворе, который несколько раз меняют. В завершение слои геля промывают дистиллированной водой. Во время промывания слой геля может отделиться от стеклянной пластинки. Чтобы этого не произошло, стеклянную пластинку перед нанесением на нее горячего агарового золя следует покрыть тонкой пленкой агара (на пластинку наливают разбавленный золь агара и дают ему высохнуть). После промывания слой геля накрывают полоской влажной фильтровальной бумаги, площадь которой должна быть на несколько квадратных сантиметров больше площади гелевого слоя. Гель вместе с бумагой высушивают под вентилятором, а затем отделяют бумагу от высушенного слоя агара. Линии преципитации можно визуализировать практически любым веществом, применяемым для окрашивания белков после электрофореза в агаровом или агарозном гелях.

Применяя только окрашивание, часто не удастся идентифицировать неизвестный антиген. В этом случае полезно сравнить электрофоретическую подвижность исследуемого антигена с таковой у известного чистого антигена (рис. 3.12).



Рис. 3.12. Идентификация антигена посредством сравнения его электрофоретической подвижности с электрофоретической подвижностью известного антигена

Подтвердить наличие определенного антигена в исследуемой смеси можно также с помощью моноспецифической сыворотки. Слияние линии преципитации, образованной на одной стороне иммуноэлектрофореграммы полиспецифической сывороткой, с линией, которую на другой стороне образует моноспецифическая сыворотка, указывает на идентичность компонента антигенной смеси и того антигена, к которому была получена моноспецифическая сыворотка (рис. 3.13).

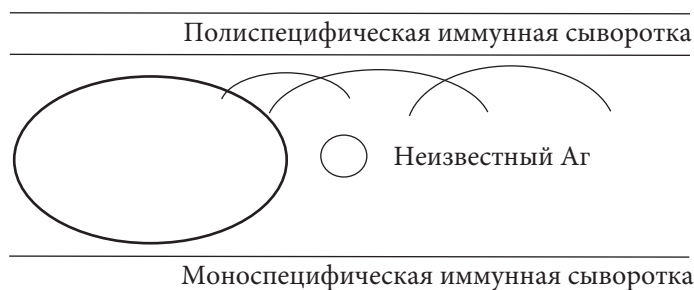


Рис. 3.13. Идентификация антигена
при помощи моноспецифической антисыворотки

Для идентификации по методу Оссермана требуется контрольный раствор известного антигена, который вносят в одну из канавок. Антиген, диффундируя в сторону канавки с антисывороткой, образует линию преципитации, параллельную канавкам. В том месте, где контрольный антиген встречается с идентичным компонентом исследуемой смеси антигенов, линия преципитации искривляется и переходит в дугу идентичного антигена (рис. 3.14).

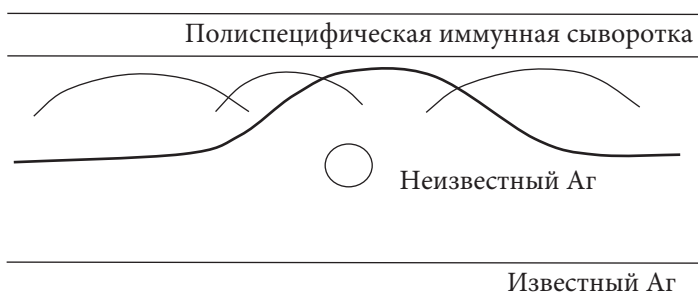


Рис. 3.14. Идентификация антигена по методу Оссермана

В основе метода Гереманса лежит реакция двух разных антигенов с антисывороткой, содержащей антитела к ним обоим. Исследуемый антиген сравнивают с контрольным по электрофоретической подвижности и одновременно проводят реакцию на иммунологическую идентичность. Для этого в канавке с антисывороткой оставляют агаровую перемычку, положение которой определяется в предварительном опыте. Перемычка должна находиться в том месте, где ожидается слияние полос преципитации исследуемого и контрольного антигенов в случае их идентичности. Поэтому метод Гереманса также называют методом разделенной канавки. Если по обе стороны перемычки будут находиться идентичные или перекрестно реагирующие антигены, произойдет слияние дуг преципитации или образование шпоры при неполной идентичности (рис. 3.15).

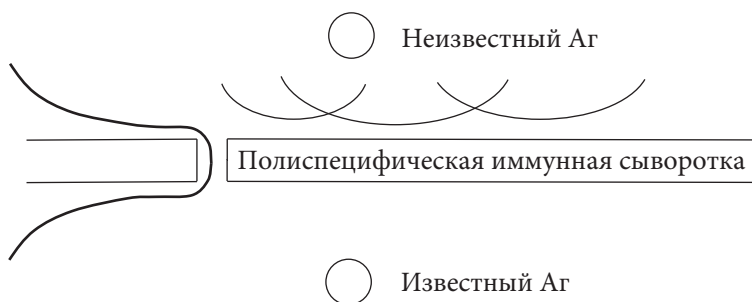


Рис. 3.15. Идентификация антигена по методу Гереманса
(методу разделенной канавки)

Иммуноэлектрофорез — один из широко распространенных методов качественного анализа антигенов. С помощью данного метода в клинической иммунологии полуколичественно определяют концентрацию иммуноглобулинов различных классов, идентифицируют миеломные белки; также ИЭФ используют при диагностике иммунодефицитных состояний. В научно-исследовательской работе ИЭФ служит основным методом анализа сложных белковых смесей. Данный метод незаменим при последовательном наблюдении за процессом очистки белковых препаратов, к нему часто обращаются и с целью контроля подлинности и чистоты этих препаратов. Применяется ИЭФ и в судебной медицине, в частности для определения видовой принадлежности крови.

Ввиду широкого использования иммуноэлектрофореза для решения разнообразных задач разработаны его варианты и модификации.

3.1.3.1. Ракетный иммуноэлектрофорез

Метод ракетного иммуноэлектрофореза (электроиммунный анализ, электроиммунодиффузия) предложен К. Лореллом в 1966 г. и может рассматриваться как сочетание иммунодиффузии по Манчини с электрофорезом. Иммуноэлектрофорез по Лореллу обычно используют для количественного определения содержания белка в жидкостях организма. Существенным преимуществом ракетного иммуноэлектрофореза по сравнению с иммунодиффузией по Манчини является быстрота получения результатов.

Рассмотрим суть этого метода. На плоской поверхности формируют слой агарозного геля, содержащий моноспецифическую антисыворотку. В полученном слое геля вырезают лунки и заполняют их исследуемым антигеном. Антиген под действием электрического поля мигрирует в геле, содержащем антитела; рН геля подбирают таким образом, чтобы антитела в нем не двигались и имели суммарный отрицательный заряд. Чаще всего используют барбиталовые или вероналовые буферы с рН 8,6.

При избытке антител сначала образуются растворимые комплексы $Ag - At$. В ходе электрофореза происходит их обогащение антителами, и когда соотношение Ag и At достигает точки эквивалентности, нерастворимые комплексы осаждаются в форме пиков, напоминающих ракету.

Ракетный иммуноэлектрофорез проводят и в обратной постановке, если требуется определить концентрацию антител. В этом случае важно правильно подобрать гель и pH для иммобилизации антигена, чтобы не нарушалась его структура и не возникало препятствий для взаимодействия $Ag - At$.

При оптимальных условиях проведения анализа формируются узкие остро-конечные преципитаты (рис. 3.16). Точные измерения показывают, что площадь образующихся преципитатов пропорциональна концентрации антигена.

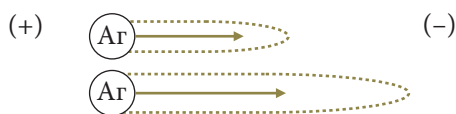


Рис. 3.16. Виды преципитатов, образующихся при ракетном иммуноэлектрофорезе

При условии, что преципитаты будут иметь описанную выше форму, для практических целей можно ограничиться измерением длины зоны преципитации от середины лунки до вершины пика. При прочих равных условиях (концентрация геля, концентрация антисыворотки в геле, толщина слоя геля, режим электрофореза) она находится в прямой зависимости от концентрации антигена.

Количественное содержание исследуемых антигенов определяют с помощью калибровочной кривой, для построения которой используют серию стандартных антигенов с известной концентрацией (рис. 3.17). По оси абсцисс

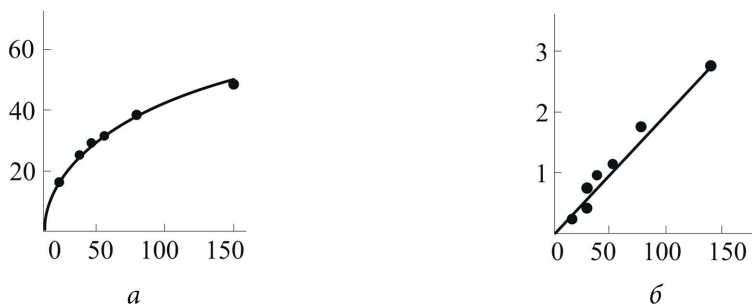


Рис. 3.17. Графики зависимости высоты (а) и квадрата высоты (б) пиков преципитации от концентрации антигена (кортикостероидсвязывающего глобулина человека).

По оси абсцисс — концентрация антигена, мкг/мл; по оси ординат:

a — высота пика, мм; b — квадрат высоты пика, $mm^2 \times 10^3$.

Приведено по: Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. Москва : Медицина, 1987. С. 472

откладывают концентрацию антигена в лунке, а по оси ординат — высоту соответствующей «ракеты». Эта зависимость нелинейна, но точки хорошо ложатся на плавную калибровочную кривую.

Учет результатов можно проводить сразу после окончания электрофореза на влажных препаратах. Если преципитаты плохо различимы, то из геля элюируют непреципитированные белки многократным промыванием солевым раствором. После этого гель вымачивают в течение 15 мин в дистиллированной воде, кладут на 10–15 мин под пресс и, наконец, сушат горячим воздухом. Сухие пластинки геля можно окрашивать обычными красителями для белков или с помощью более специфических реакций.

3.1.3.2. Встречный иммуноэлектрофорез (электросинерез)

Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ) впервые применил в 1959 г. А. Буссард для обнаружения преципитатов $Ag - At$.

Принцип встречного иммуноэлектрофореза заключается в одновременном движении в геле навстречу друг другу антигена и антител под действием постоянного электрического тока. В результате их специфического взаимодействия в слое носителя образуется линия преципитата. В отличие от метода двойной иммунодиффузии по Оухтерлони контакт антигена с антителами происходит не вследствие свободной диффузии, а под влиянием постоянного электрического поля. Необходимым условием для ВИЭФ является наличие моноспецифической преципитирующей сыворотки (рис. 3.18).

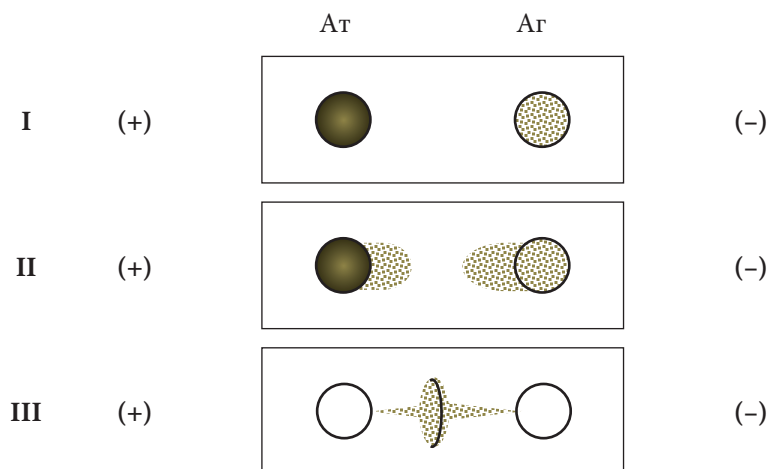


Рис. 3.18. Принципиальная схема встречного иммуноэлектрофореза в агаровом геле: I — в лунку у анодного края пластинки с гелем вносят иммунную сыворотку (At), у катодного края — раствор Ag; II — в процессе электрофореза антитела перемещаются к катоду, а антиген движется к аноду; III — в месте встречи At и Ag при оптимальном соотношении иммунореагентов формируется линия преципитации

Предназначен встречный иммуноэлектрофорез для обнаружения и идентификации преципитирующих систем Аг — Ат при условии, что антиген и иммуноглобулины (антитела) обладают электрофоретической подвижностью.

Белки представляют собой амфолиты; ввиду различий в аминокислотном составе они могут мигрировать в щелочной среде с разными скоростями и в разных направлениях (анодном, катодном). Это делает возможным их движение навстречу друг другу в слое геля или на ацетатцеллюлозной пленке. Преципитация наблюдается между стартовыми лунками обоих компонентов в течение 30–180 мин в зависимости от приложенного напряжения.

На практике встречный иммуноэлектрофорез наиболее часто используют в клинической диагностике для обнаружения и идентификации некоторых антигенов и антител: для идентификации антигена вирусного гепатита В, антител к *Aspergillus* при бронхолегочном аспергиллезе, антител к *N. meningitidis*, антител к ДНК при системной красной волчанке. По чувствительности этот метод в 2 раза — 10 раз превосходит метод иммунодиффузии, но при определении антител чувствительность метода ВИЭФ снижается.

Большинство преципитирующих антител относится к иммуноглобулинам класса G, обладающим лишь очень слабым отрицательным зарядом при pH 8–9. Поэтому электроосмотический поток смещает IgG к катоду. Электроэндосмос заметно уменьшается при замене агара агарозой. Путем подбора определенных соотношений агара и агарозы можно регулировать скорость эндосмоса, создавая тем самым оптимальные условия для электросинереза. Если расположить рядом несколько лунок с антигеном, то их можно сравнивать между собой подобно тому, как это делается при применении метода двойной иммунодиффузии. Видимые линии преципитации образуются в течение 1–2 ч. Избыток реагентов удаляют, продолжая электрофорез после образования преципитатов. При этом нет надобности отмывать гель перед окрашиванием, что позволяет в течение 3–4 ч получить полную картину окрашенных полос преципитации.

3.1.3.3. Перекрестный (двумерный) иммуноэлектрофорез

Метод был разработан Н. Ресслером в 1960 г. и усовершенствован К. Б. Лореллом в 1965 г. Перекрестный иммуноэлектрофорез по сравнению с другими иммуноэлектрофоретическими методами дает большее разрешение и нашел широкое применение в общей и медицинской биохимии, клеточной биологии, генетике, биологии развития.

Принцип метода. При проведении перекрестного иммуноэлектрофореза сложную смесь антигенов предварительно с помощью электрофореза разделяют в одном направлении, а затем — в другом (перпендикулярном первому) в слое агарозного геля, содержащего антитела.

Классический вариант перекрестного иммуноэлектрофореза включает три основных этапа.

На первом этапе исследуемую смесь антигенов подвергают электрофорезу в геле агарозы (рис. 3.19).

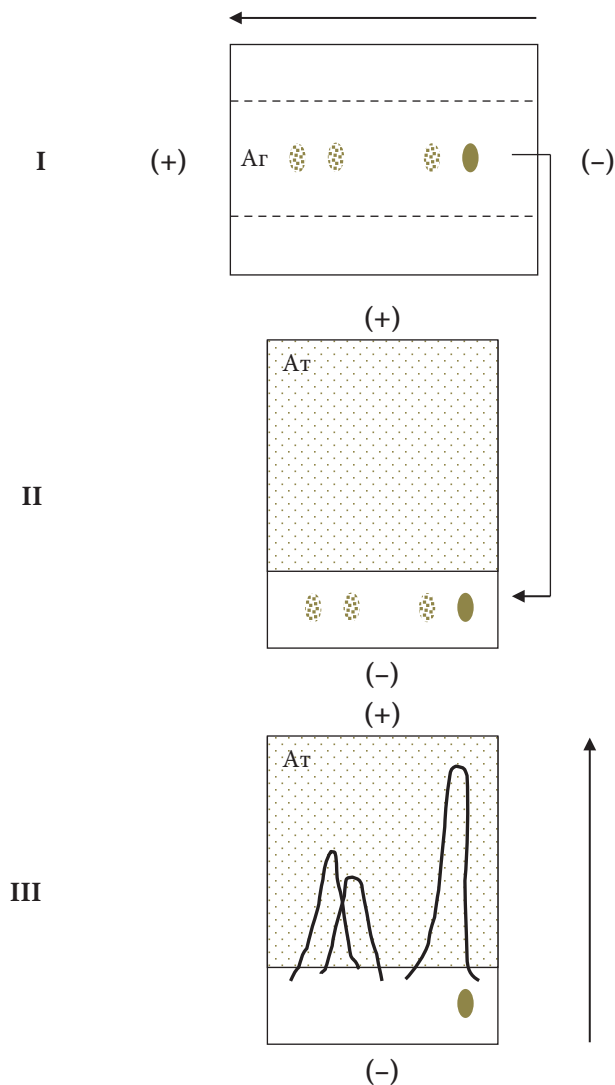


Рис. 3.19. Схема перекрестного иммуноэлектрофореза:

I — смесь антигенов подвергают электрофорезу в агарозном геле; II — полоску геля с фракциями антигенов (ограничена прерывистой линией) вырезают и прикладывают к другому гелю, содержащему антисыворотку; III — после второго электрофореза в направлении, перпендикулярном первому, в геле формируются пики преципитации

На втором этапе полоску геля с антигенными фракциями отрезают и переносят ее на другую пластинку, размещая у катодного края. Свободную площадь

второй пластинки заливают гелем агарозы, содержащим полиспецифическую антисыворотку.

На третьем этапе после застывания геля проводят второй электрофорез в направлении, перпендикулярном направлению первого разделения. При этом антитела, содержащиеся в геле, образуют с исследуемыми белками преципитаты в форме пиков, площадь которых прямо пропорциональна содержанию антигенов в геле.

Все описанные процедуры можно проводить на одной стеклянной пластинке: после электрофореза в первом направлении на пластинке оставляют лишь одну полоску геля с антигенными фракциями; остальной гель удаляют, а на его место заливают раствор агарозы с антителами и проводят второй электрофорез.

Оценка результатов. Перекрестный иммуноэлектрофорез позволяет оценить как качественный, так и количественный состав сложной смеси антигенов.

На двумерных иммуноэлектрофореграммах антигены идентифицируют по электрофоретической подвижности и форме пика преципитации. Иногда этих данных для окончательной идентификации антигенов оказывается недостаточно. В этих случаях проводят дополнительный анализ с использованием контрольного известного антигена. Его добавляют в исследуемую смесь антигенов, и при наличии в ней идентичных антигенов высота соответствующего пика преципитации будет увеличиваться по сравнению с высотой пика на исходной иммунофореграмме смеси (рис. 3.20).

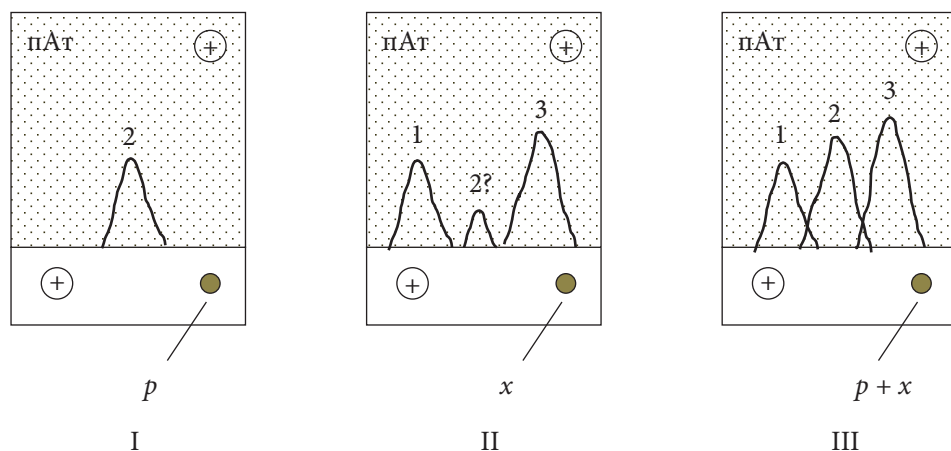


Рис. 3.20. Идентификация антигена в перекрестном иммуноэлектрофорезе с помощью контрольного известного антигена. Иммуноэлектрофореграммы: I — контрольного антигена (p); II — исследуемой смеси антигенов (x); III — смеси $p + x$

Для количественного определения белков есть несколько способов. Измерив высоту пика (h) и длину его основания (b), площадь пиков можно рас-

считать по формуле $S = 1/2 \cdot h \cdot b$. Этот способ вполне надежен, но пригоден для анализа лишь симметричных пиков преципитации.

Если в перекрестном иммуноэлектрофорезе сформировались резко асимметричные пики, то их площадь следует определять, взвешивая соответствующие бумажные копии. Увеличенное изображение иммуноэлектрофореграммы проецируют на бумагу, и интересующий объект обводят карандашом. Затем диаграмму вырезают, взвешивают и сравнивают по массе с диаграммами стандартной смеси. Результаты выражают в процентах от нормы или в абсолютных величинах.

Однако быстрее и проще оценивать пик по его высоте. Достоверно было показано, что метод измерения высоты пиков по воспроизводимости сопоставим с предыдущим методом.

3.1.4. Реакция нейтрализации

Реакция нейтрализации (РН) — это иммунологическая реакция, основанная на способности антител связывать различные микроорганизмы или их метаболиты (токсины, ферменты). При связывании с антителами возбудители или токсины утрачивают свои биологические свойства, то есть нейтрализуются. На практике данные реакции применяют для выявления вирусов и различных токсинов.

РН позволяет решить следующие диагностические задачи:

- идентифицировать неизвестный (выделенный) вирус;
- обнаружить и определить титр вируснейтрализующих антител;
- идентифицировать экзотоксин, продуцируемый неизвестным возбудителем;
- определить активность антитоксических лечебных сывороток;
- выявить антитела к ферментам бактерий, таких как антистрептолизины, антистафилолизины, антистрептокиназы.

Идентификацию неизвестного вируса осуществляют путем исследования его с различными заведомо известными сыворотками (антителами).

Компоненты реакции при идентификации возбудителя:

- исследуемый вирус;
- диагностическая вируснейтрализующая сыворотка;
- индикаторная система (культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторные животные).

Стандартную диагностическую сыворотку смешивают в пробирке с биоматериалом, содержащим исследуемый вирус. Смесь выдерживают в термостате определенное время. Затем этой смесью заражают культуру клеток, куриный эмбрион или лабораторное животное. За состоянием живых объектов наблюдают и через соответствующий срок учитывают результат нейтрализации.

При положительной реакции, то есть при нейтрализации вируса антителами индикаторные объекты продолжают нормально существовать, а контрольные погибают либо у них в результате цитопатического действия вируса обнаруживаются характерные изменения. В таком случае делается вывод, что это именно тот вирус, стандартную сыворотку к которому использовали.

Серодиагностика вирусных болезней. Так называют способ диагностики вирусных патогенов по наличию в крови больных высоких титров вирусспецифических антител. При серодиагностике вирусных инфекций с помощью реакции нейтрализации в сыворотке крови больных определяют вируснейтрализующие антитела по известному вирусу.

Компоненты реакции при серодиагностике вирусных инфекций:

- исследуемая сыворотка;
- известный вирус — диагностикум;
- индикаторный объект.

С учетом того, что вируснейтрализующие антитела вырабатываются медленно, реакцию нейтрализации ставят в динамике с парными сыворотками, одну из которых берут в разгаре заболевания, а вторую — спустя 2–3 недели, и по четырехкратному нарастанию титра антител в последней сыворотке подтверждают диагноз.

Идентификация токсина. При диагностике некоторых инфекционных заболеваний, возбудители которых продуцируют экзотоксины, используют реакцию нейтрализации токсина антитоксином. Реакция нейтрализации токсинов позволяет идентифицировать бактериальные экзотоксины по их видовой и типовой принадлежности.

Для проведения реакции нейтрализации токсина антитоксином исследуемый материал, в котором подозревают наличие токсина, смешивают с соответствующей антитоксической сывороткой и после инкубации в термостате вводят лабораторным животным (белым мышам, морским свинкам). Контрольным животным вводят только исследуемый материал. Если антитоксическая сыворотка токсин нейтрализует, животные останутся живы. Контрольные животные под действием токсина погибнут. Данная реакция используется для выявления токсинов возбудителей ботулизма, столбняка, газовой гангрены.

Реакция нейтрализации токсина антитоксином имеет большое практическое значение как метод определения активности антитоксических лечебных сывороток. Антигеном в данной реакции является истинный экзотоксин. Для этой цели часто используется реакция нейтрализации по механизму флоккуляции. В результате взаимодействия токсина или анатоксина с антитоксической сывороткой выпадают хлопья флоккулята. Наиболее интенсивная и ранняя («инициальная») флоккуляция происходит в пробирке, где антиген и антитела

содержатся в эквивалентных соотношениях, то есть количественное содержание токсина соответствует количеству международных единиц сыворотки.

Достоинствами реакций нейтрализации являются их универсальность и высокая специфичность; недостатками — большая трудоемкость; строгое соблюдение стерильности материалов, посуды и инструментов; высокая стоимость живых биологических систем; относительная длительность исследования и необходимость проведения математических расчетов.

3.1.5. Реакции связывания комплемента

Уникальная способность комплемента специфически связываться с различными по своей природе комплексами «антиген — антитело» нашла применение в реакции связывания комплемента (РСК), предложенной в 1901 г. Ж. Борде и О. Жангу.

Особое достоинство реакции связывания комплемента состоит в том, что природа антигена, участвующего в ней (корпускулярная или растворимая), не имеет значения, так как комплемент связывается с Fc-фрагментом любого антитела, относящегося к IgG и IgM, независимо от его антителной специфичности.

Антитела IgM и IgG (1, 2, 3) в составе иммунного комплекса приобретают способность связывать Clq — субкомпонент первого компонента комплемента, что вызывает последовательную активацию остальных белков системы комплемента по так называемому классическому пути. Последствия активации системы комплемента определяются природой входящего в него антигена. Сборка мембраноатакующего комплекса (C5b — C9) обуславливает гемолиз и лизис некоторых грамотрицательных бактерий — бактериолиз. Связывание комплемента иммунными комплексами, антиген в которых представлен растворимыми соединениями, а также грамположительными бактериями, не приводит к видимым последствиям. Однако в результате связывания с иммунным комплексом белки комплемента претерпевают необратимые изменения, комплемент теряет способность лизировать sensibilized эритроциты. Реакция связывания комплемента основана на этих закономерностях активации комплемента.

Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом «антиген — антитело». Если образования иммунного комплекса не происходит, комплемент остается свободным и соединяется со второй системой, вызывая гемолиз, что сопровождается видимыми изменениями.

Реакция связывания комплемента относится к сложным серологическим реакциям. В ней участвуют комплемент и две системы «антиген — антитело». По существу, это две серологические реакции. Для проведения РСК необходимы 5 основных ингредиентов:

- | | | |
|---|---|------------------------------------|
| — антиген (обычно лизат, экстракт, гаптен;
реже — взвесь); | } | Первая система,
диагностическая |
| — антитела (исследуемая сыворотка); | | |
| — комплемент; | } | Вторая система,
индикаторная |
| — антиген (эритроциты барана); | | |
| — антитело (гемолизин к эритроцитам барана). | | |

Первая система — диагностическая, включающая антиген и антитела (один компонент известный, другой — нет). К ней добавляют определенное количество комплемента, и смесь выдерживают некоторое время для завершения реакции. При соответствии антигена и антител этой системы во время инкубации происходит образование комплекса «антиген + антитело + комплемент». При отсутствии определяемого иммунореагента иммунные комплексы не образуются, и комплемент остается свободным. Внешне образование иммунных комплексов никакими феноменами не проявляется (рис. 3.21).

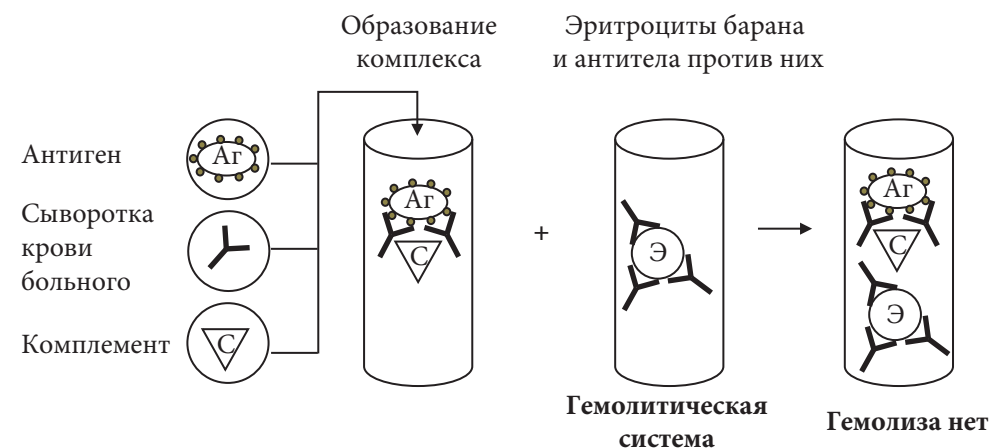
О связывании комплемента иммунным комплексом узнают с помощью второй системы — индикаторной. В нее входят эритроциты барана (антиген) и соответствующая им гемолитическая сыворотка (антитела), то есть готовый иммунный комплекс. Специфические антитела, обуславливающие лизис клеток, называются лизинами, применительно к эритроцитам — гемолизинами. Гемолизины способны проявить свое лизирующее действие на эритроциты только в присутствии комплемента.

Если в первой фазе реакции происходит связывание комплемента, то прибавленные к смеси во второй фазе реакции сенсibilизированные эритроциты не лизируются. Отсутствие гемолиза регистрируют как положительный результат РСК.

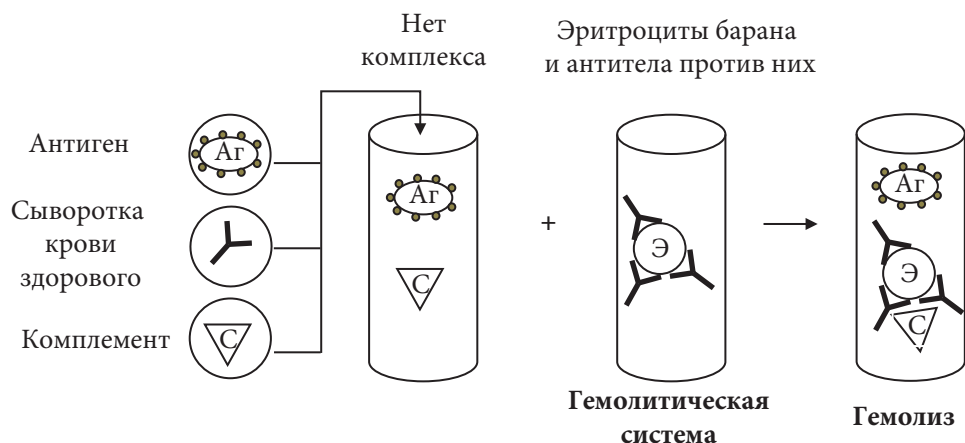
Если иммунный комплекс не образовался, то оставшийся свободным комплемент обуславливает лизис сенсibilизированных эритроцитов. Гемолиз во второй фазе реакции свидетельствует об отсутствии искоемых антигенов или антител.

Для контроля необходимо одновременно ставить реакции точно в тех же условиях с нормальной сывороткой и сывороткой, дающей заведомо положительный результат.

Антигеном для постановки реакции связывания комплемента могут быть культуры разнообразных убитых микробов, их лизаты, компоненты бактерий, экстракты, полученные из патологически измененных и нормальных органов и тканей.



а



б

Рис. 3.21. Схема реакции связывания комплемента с сывороткой крови больного (а) и здорового (б):
Аг — антиген; Э — эритроциты; С — сыворотка крови

В силу того что все микробные антигены адсорбируют какое-то количество комплемента, перед титрованием их проверяют на антикомплментарные свойства, определяя растворяющую дозу комплемента, то есть то наибольшее количество антигена, которое не вызывает задержки гемолиза.

Таким образом, для постановки РСК необходимы следующие подготовленные ингредиенты (см. рис. 3.21):

1) сыворотка, подлежащая исследованию, инактивированная при 56 °C в течение 30 мин в водяной бане;

- 2) антиген (взвесь бактерий или экстракт из них), не вызывающий самостоятельно ни гемолиза, ни задержки его в дозе, установленной титрованием;
- 3) комплемент в рабочей дозе, установленной титрованием;
- 4) гемолитическая сыворотка в дозе, соответствующей ее утроенному титру;
- 5) 3 % взвесь бараньих эритроцитов;
- 6) физиологический раствор.

Учет результатов РСК. Проводится по системе 4+.

(+++++) — 100 % связывание антигена антителами и образование комплексов «антиген + антитело + комплемент». Полная задержка гемолиза: после центрифугирования в пробирке образуется осадок эритроцитов, супернатант прозрачный, бесцветный.

(+++) — 75 % связывание антигена антителами. Определенная часть комплемента остается в свободном виде и активируется гемолитической системой. Явная задержка гемолиза: после центрифугирования на дне пробирки виден осадок эритроцитов, супернатант имеет слегка желтоватую окраску из-за лизиса части эритроцитов.

(++) — 50 % связывание антигена антителами. Половина комплемента находится в свободном виде и вызывает гемолиз практически половины эритроцитов индикаторной системы. Частичная задержка гемолиза: после центрифугирования на дне пробирки виден осадок эритроцитов, супернатант интенсивно окрашен в красно-оранжевый цвет.

(+) — сомнительный результат. Очень слабая задержка гемолиза: после центрифугирования на дне пробирки — незначительный осадок эритроцитов, супернатант окрашен так же, как при отрицательной РСК.

(-) — отрицательный результат РСК. Полный гемолиз: после центрифугирования на дне пробирки осадка нет, а все содержимое представляет собой прозрачный красно-оранжевый раствор — «лаковую кровь».

Применение РСК. Реакция связывания комплемента, обладающая высокой чувствительностью, приобрела большое диагностическое значение. С ее помощью можно зарегистрировать образование иммунного комплекса в тех случаях, когда видимые проявления реакции «антиген — антитело», такие как преципитация, агглютинация или флоккуляция, отсутствуют. В РСК могут быть использованы как растворимые, так и нерастворимые антигены. Благодаря высокой чувствительности, в 100–200 раз превышающей чувствительность реакции преципитации, в РСК анализируют системы с низким содержанием антигенов и антител.

РСК применяется преимущественно для диагностики инфекционных заболеваний. В целях диагностики в исследуемых сыворотках крови можно определять антигены с помощью диагностической сыворотки. Однако чаще

в сыворотке крови определяют специфические антитела, используя антигены-диагностикумы.

3.1.5.1. Реакция радиального гемолиза

Реакция радиального гемолиза (РРГ) — вариант реакции связывания комплемента. Ее ставят в агаровом геле, содержащем эритроциты барана и комплемент. В застывшем слое геля делают лунки и вносят в них гемолитическую сыворотку (антитела против эритроцитов барана). В результате радиальной диффузии антител вокруг лунок образуются зоны гемолиза. Радиус зоны гемолиза прямо пропорционален титру сыворотки. Таким образом можно определить активность гемолитической сыворотки.

Для определения активности комплемента с помощью реакции радиального гемолиза в лунки геля, содержащего эритроциты барана, сенсibilизированные антителами, вносят исследуемую и нормальную сыворотки в разных разведениях. Вокруг лунки, содержащей активный комплемент, образуется зона гемолиза, диаметр которой пропорционален количеству комплемента в исследуемой сыворотке (рис. 3.22).

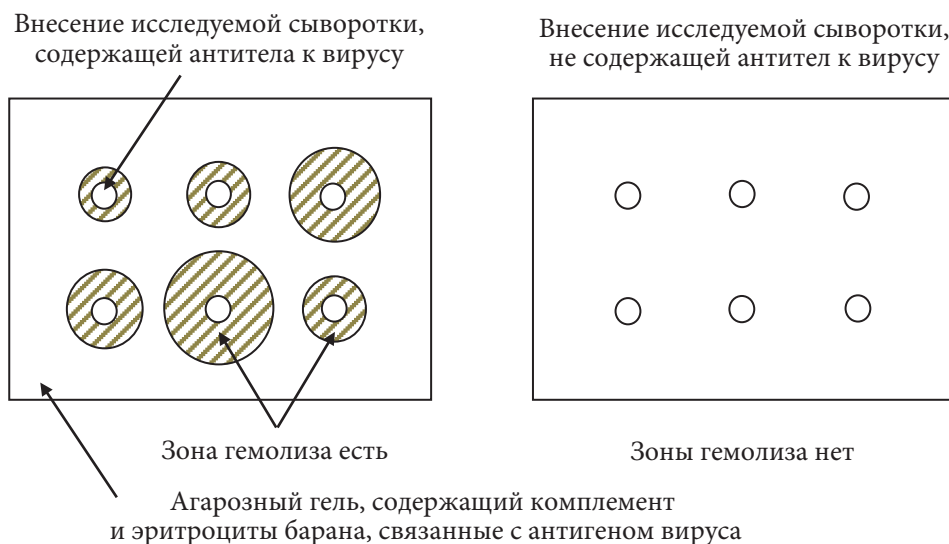


Рис. 3.22. Радиальный гемолиз, вызванный антителами

Данный метод дает возможность определять общую активность компонентов классического пути активации, однако если в сыворотке обнаружен дефицит комплемента, РРГ не позволяет установить, отсутствием какого компонента дефицит обусловлен. В настоящее время эта реакция используется нечасто.

РРГ применяется также в серодиагностике для выявления антител против возбудителей вирусных инфекций. Как и в первом случае, в гель вводят комплемент и эритроциты барана, но на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены, например гликопротеиновый гемагглютинин вируса гриппа, краснухи или клещевого энцефалита. В лунки вносят исследуемую сыворотку крови. Антигемагглютининовые антитела сыворотки крови, диффундируя в гель, взаимодействуют с вирусными антигенами на эритроцитах. Затем к комплексу «антиген + антитело» присоединяется комплемент, что заканчивается активацией системы комплемента и гемолизом.

Реакция радиального гемолиза в геле нашла применение в диагностике вирусных инфекций благодаря простоте постановки и нечувствительности к сывороточным ингибиторам.

3.1.5.2. Реакция иммунного прилипания

Реакция иммунного прилипания (РИП) — специфическая иммунологическая реакция, наступающая в результате образования комплекса «антиген + антитело + комплемент» и его взаимодействия с рецепторами тромбоцитов и эритроцитов и выражающаяся в образовании агглютинатов.

Основана реакция иммунного прилипания на активации системы комплемента корпускулярными антигенами, обработанными иммунной сывороткой. Если к антигену (бактерии, вирусу и др.) добавить соответствующую иммунную сыворотку и комплемент, то сначала образуется комплекс «антиген + антитело», который затем присоединяет и активирует комплемент. В результате нарабатывается активированный компонент комплемента C3b, присоединяющийся к корпускулярному антигену в составе иммунного комплекса. Эритроциты, тромбоциты и другие клетки крови имеют на поверхности рецепторы к C3b. При смешивании этих клеток с иммунными комплексами благодаря C3b-компоненту комплемента происходит взаимодействие комплекса «антиген + антитело + комплемент» с индикаторными клетками, что сопровождается их соединением и агглютинацией.

Результат реакции оценивают микроскопически путем подсчета процентного количества эритроцитов, присоединившихся к корпускулярному антигену, сенсibilизированному антителами и комплементом, а также путем определения характера осадка эритроцитов, как в реакции пассивной гемагглютинации.

Применяется РИП для определения антигенных свойств бактерий, вирусов, лейкоцитов; для определения *in vitro* активности разнообразных антител и антигенов, а также комплемента; для определения антигенов главного комплекса гистосовместимости.

3.2. Методы с использованием меток (меченых реагентов)

3.2.1. Радиоиммунный анализ

Радиоиммунный анализ (РИА) был предложен в конце 1950-х гг. Р. Ялоу и С. Берсон для определения уровня эндогенного инсулина в плазме крови человека. В 1977 г. Р. Ялоу была удостоена Нобелевской премии.

РИА — метод количественного определения биологически активных веществ (гормонов, ферментов, маркеров злокачественных новообразований, лекарственных средств, наркотиков и других веществ) в биологических жидкостях. Основан данный метод на конкурентном связывании определяемых и аналогичных им меченных радионуклидами веществ со специфическими связывающими системами. Последними чаще всего являются специфические антитела.

Чувствительность радиоиммунного анализа очень высока. Некоторые методики позволяют выявлять очень низкие концентрации веществ, до 10^{-14} моль/л. Особенно важна чувствительность при измерении концентраций пептидных гормонов (эти концентрации обычно находятся в пределах от 10^{-13} до 10^{-10} моль/л), а также при определении наркотиков, лекарственных средств, ферментов, бактериальных и вирусных антигенов.

Специфичность радиоиммунного анализа определяется специфичностью антител и может быть чрезвычайно высокой. Получены антитела и разработаны методики РИА, позволяющие дифференцировать антигены с малейшими структурными различиями, в том числе:

- гормоны щитовидной железы — трийодтиронин — T_3 и тетраiodтиронин (тироксин) — T_4 (различаются одним атомом йода);
- гормоны коры надпочечников — кортизол и кортикостерон (различаются одним гидроксильным радикалом);
- инсулины человека и свиньи (различаются концевой аминокислотой В-цепи);
- инсулины свиньи, кашалота и собаки (имеют одинаковую последовательность аминокислот, но разную конформацию).

В качестве метки для радиоиммунного анализа применяют радиоактивные изотопы (^{131}I , ^{125}I или ^3H и ^{14}C). В подавляющем большинстве случаев используются изотопы йода (^{125}I) и трития (^3H).

Соединения, меченные тритием, достаточно устойчивы, поскольку период полураспада изотопа — 12 лет, и практически идентичны по своему поведению немеченым лигандам. Однако при работе с мечеными тритием соединениями требуется дополнительная стадия пробоподготовки образцов перед измерением β -излучения на жидкостных сцинтилляционных счетчиках, а низкая удельная

активность данных соединений (не более 100 Ки/моль) влечет за собой увеличение времени счета в анализе.

Мечение лигандов изотопом ^{125}I дает возможность получить соединение с высокой удельной радиоактивностью (например, удельная радиоактивность йодированных стероидов составляет более 1000 Ки/моль), и это явилось основной причиной того, что в настоящее время в качестве метки используют в основном радионуклиды йода. Кроме того, подсчет γ -излучения представляет собой значительно более простую и дешевую операцию, чем регистрация β -излучения. Среди большого числа методов, позволяющих ввести ^{125}I в органическую молекулу, применяют только те, которые обеспечивают сохранность ее биологической и иммунологической активности. В связи с этим следует подбирать такие способы мечения высокомолекулярных соединений, которые минимально нарушают их структуру. Из числа таких способов наиболее часто используют химическое и ферментативное окислительное йодирование. Включение ^{125}I в вещества с низкой молекулярной массой вызывает выраженное изменение их молекулярной структуры, что значительно влияет на иммуногенность меченого соединения.

Соответственно, разработка рациональной процедуры йодирования требует знания структуры и свойств того вещества, которое нужно ввести в метку, и информации о свойствах антител к нему.

Можно получить меченые соединения *in vitro* восстановительным метилированием (превращением аминок групп в моно- или диметиламиногруппы). Этот метод позволяет без затруднений вводить в соединения двойную метку — ^3H и ^{14}C .

Для измерения радиоактивной метки, то есть излучения, используют специальные счетчики — радиометры. Подсчет радиоактивных импульсов как в контрольных, так и в исследуемых образцах проводится в течение фиксированного времени, обычно в течение одной минуты. При анализе результатов реакции необходимо учитывать наличие фона радиоактивности, который может повлиять на конечный результат. Причиной повышения фона могут быть загрязнение контейнера или гнезда для пробы; неправильная настройка прибора; наличие сильного источника излучения вблизи прибора.

В зависимости от техники постановки выделяют два основных способа радиоиммунного анализа: жидкофазный (классический) и твердофазный.

Жидкофазный конкурентный РИА основан на феномене конкуренции определяемого антигена с известным количеством меченых антигенов за ограниченное количество специфических к антигену антител, введенных в систему. Чем больше в исследуемой жидкости содержится определяемого антигена, тем меньше меченых антигенов свяжется с антителами и, следовательно, больше останется в растворе.

Основными компонентами тест-системы для жидкофазного РИА являются:

- меченный радиоизотопом и немеченый антигены;
- антитела к анализируемому антигену;
- стандартные контрольные образцы;
- система отделения свободного антигена от образовавшегося иммунного комплекса.

Методика проведения жидкофазного конкурентного РИА включает 4 основных этапа.

1. К раствору антител добавляют меченый антиген и пробу, содержащую неизвестное количество определяемого антигена. Концентрацию антител в реакционной смеси подбирают так, чтобы число мест связывания было намного меньше общего числа антигенов. Концентрация меченого антигена должна превышать максимально возможную концентрацию определяемого антигена в пробе.

2. Реакционную смесь инкубируют при определенной температуре. Меченый и немеченый антигены конкурентно связываются с антителами, при этом образуются иммунные комплексы, содержащие либо меченый, либо немеченый антиген. Таким образом, к концу инкубации в реакционной смеси присутствуют меченые и немеченые иммунные комплексы, а также свободные меченые и немеченые антигены. Количество меченых иммунных комплексов обратно пропорционально количеству немеченого антигена в пробе.

3. Для того чтобы оценить количество меченых иммунных комплексов, их надо отделить от свободного меченого антигена. Наиболее распространены два способа разделения:

а) к реакционной смеси добавляют вещество, повышающее ее плотность, например полиэтиленгликоль;

б) к реакционной смеси добавляют вещество с большой молекулярной массой, которое специфически связывается с антителами в составе иммунных комплексов (для этого используют вторые антитела либо стафилококковый белок А).

В обоих случаях иммунные комплексы, имеющие большую молекулярную массу, чем свободные антигены, осаждают центрифугированием и затем измеряют радиоактивность осадка.

4. Концентрацию антигена в пробе определяют по калибровочной кривой. Для ее построения используют несколько стандартных калибровочных растворов с известными концентрациями немеченого антигена.

Недостаток этой техники постановки — необходимость специального разделения свободного и связанного меченого антигенов (или антител).

В твердофазном РИА один из иммунореагентов иммобилизуется на твердом носителе. В качестве твердой фазы применяются полистироловые шарики или пробирки.

Неконкурентный твердофазный РИА

Компоненты реакции:

- определяемый антиген;
- специфические антитела известной концентрации, связанные на сорбенте;
- идентичные связанному антителу антитела, меченные радиоизотопом;
- стандартный антиген;
- буферный раствор.

К связанным антителам добавляют определяемый антиген. В процессе инкубации на сорбенте образуются комплексы «антиген — антитело». Сорбент отмывают от свободных компонентов и добавляют меченные радиоизотопом антитела, которые связываются со свободными валентностями антигена в составе комплекса. Величина радиоактивности пропорциональна концентрации определяемого антигена. Данный тест на практике используется для определения HBs-антигена.

Конкурентный твердофазный РИА

Метод основан на конкуренции антигенов (определяемого и меченого) за присоединение к адсорбированным на сорбенте антителам.

Компоненты реакции:

- определяемый антиген (исследуемый материал);
- меченный радиоизотопом антиген;
- специфичные антитела известной концентрации, связанные на сорбенте;
- стандартный антиген;
- буферный раствор.

Сначала в реакцию вводят определяемый антиген. Происходит образование комплексов «антиген — антитело» на поверхности сорбента. Сорбент отмывают, затем вводят меченый антиген. Чем выше содержание определяемого антигена, тем меньше меченого иммунореагента свяжется на поверхности сорбента. Концентрацию меченого антигена определяют измерением радиоактивности реакции с помощью счетчиков. Величина радиоактивности реакции будет обратно пропорциональна концентрации антигена в исследуемой пробе.

Иммунорадиометрический анализ

Определение антител с помощью изотопной метки получило название иммунорадиометрического анализа. В качестве примера рассмотрим радиоаллергосорбентный тест (РАСТ).

Радиоаллергосорбентный тест был разработан в начале 1970-х гг. (Л. Вайд) для определения реагинов — IgE в сыворотке крови (рис. 3.23). Аллерген сор-

бирова́ли на пористом носителе (бумага, полимерные мембраны, гранулы, губки). Далее добавляли сыворотку крови пациента, инкубировали в течение 3 ч, отмывали и вносили антиглобулиновую сыворотку (против IgE), меченную радиоактивным изотопом. После отмывки несвязавшихся реагентов радиоактивность учитывали на счетчике.

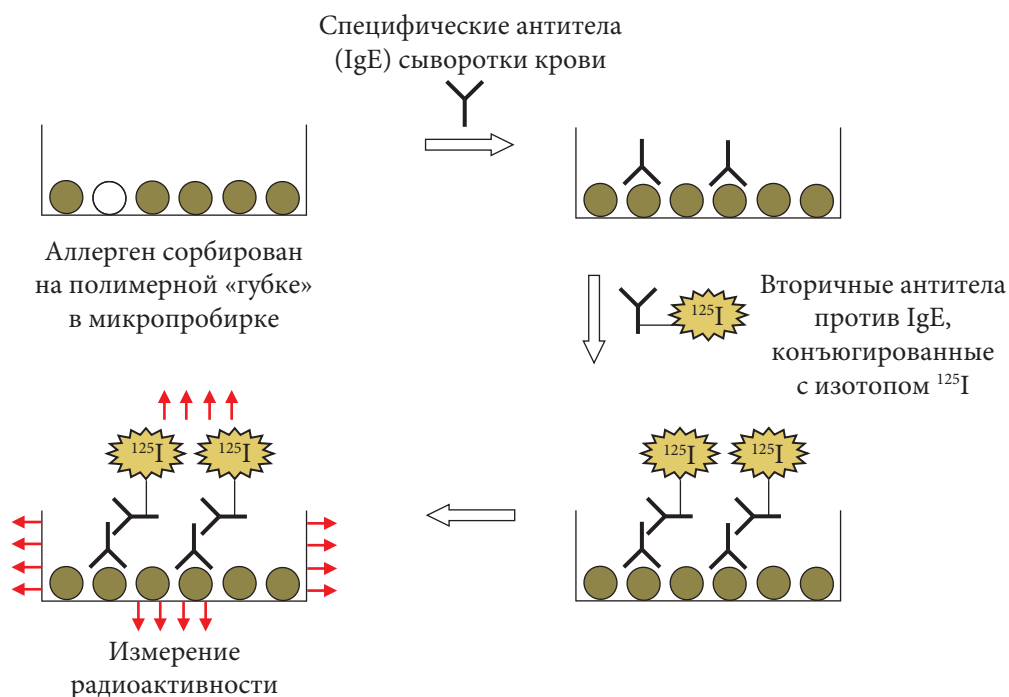


Рис. 3.23. Схема радиоаллергосорбентного теста

Первые тесты характеризовались низкой чувствительностью, плохо коррелировали с клиникой и другими аллергологическими тестами и не нашли широкого применения.

В конце 1970-х гг. были предложены РАСТ второго поколения (бóльшая чувствительность за счет меньшей специфичности и увеличения времени проведения теста; тесты по-прежнему носили качественный характер).

Наконец, в 1980–1990-х гг. распространились РАСТ третьего поколения. Бóльшие чувствительность и специфичность за счет использования моноклональных антител против IgE, автоматизация, применение IgE стандартов ВОЗ позволили получать количественные результаты.

В медицине радиоиммунный анализ считается наиболее информативным методом оценки функционального состояния щитовидной железы, поскольку он позволяет определить уровень тиреоидных гормонов в крови. Зарубежные

фирмы выпускают для радиоиммунологических исследований специальные стандартные наборы иммуносорбентов. С их помощью можно определять в сыворотке крови уровни ТТГ, Т4, Т3, тиреотропин-рилизинг-гормона (ТРГ); тиреолиберина, тиреокальцитонина (ТК) — гормона, синтезируемого С-клетками щитовидной железы.

Радиоиммунный анализ позволяет решать и актуальнейшую задачу онкологии — раннюю диагностику злокачественных новообразований, поскольку с его помощью можно выявлять онкомаркеры — вещества, продуцируемые опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли. От веществ, продуцирующихся нормальными клетками, эти вещества отличаются качественно или количественно. На ранних стадиях онкологического заболевания, при небольшой массе опухоли, диагностировать злокачественное новообразование не всегда возможно, а в РИА обнаруживаются даже незначительные концентрации онкомаркеров, что важно для своевременной оценки ситуации и своевременного лечения.

РИА также можно использовать в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой системы, для установления причин бесплодия, нарушения развития плода, для определения концентрации в крови иммуноглобулинов, ферментов и др.

Наряду с несомненными достоинствами, о которых было сказано выше, радиоиммунный анализ имеет и определенные недостатки:

- ограниченный срок жизни радиоактивной метки, что вызывает необходимость постоянной замены реактивов;
- относительно дорогое специальное оборудование для регистрации радиоактивности;
- необходимость специальных мер предосторожности и высокой квалификации обслуживающего персонала.

Именно эти трудности послужили исходным моментом для поиска методов, альтернативных РИА, но сохраняющих его высокую чувствительность, специфичность и экспрессность.

3.2.2. Флуоресцентный иммунный анализ

Реакция иммунофлуоресценции (метод Кунса) основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флуорофорами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминесцентного микроскопа. Различают три основные разновидности метода Кунса: прямой, непрямой, с комплементом. Флуоресцентный иммунный анализ (ФИА) относится к гетерогенным методам, поэтому после каждой операции следует отмывка несвязанных компонентов.

Прямой метод ФИА заключается в выявлении антигена с помощью иммунной сыворотки, меченной флуорофором.

Компоненты прямого ФИА:

- исследуемый материал (антиген); антигенами могут быть культуры бактерий, грибов, простейших; срезы тканей, препараты из материалов от больных людей (кал при холере, мокрота при коклюше); инфицированные культуры клеток;
- меченая специфическая иммунная сыворотка, содержащая антитела к искомому антигену;
- изотонический раствор хлорида натрия.

На фиксированный препарат наносят конъюгат (флуоресцирующую сыворотку к предполагаемому антигену) и инкубируют определенное время. Далее препарат отмывают от несвязанного конъюгата, подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом. На том участке, где локализуются комплексы «антиген — антитело», обнаруживают флуоресценцию — свечение. Бактерии в мазке, обработанные такой специфической сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Чаще всего прямой метод флуоресцентного иммунного анализа применяют для идентификации неизвестного антигена. Недостатком этого метода является необходимость иметь в наличии сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Непрямой метод ФИА заключается в выявлении комплекса «антиген — антитело» с помощью антиглобулиновой (против антител) сыворотки, меченной флуорофором.

Компоненты непрямого ФИА:

- исследуемый материал;
- специфическая антисыворотка;
- антиглобулиновая сыворотка, меченная флуорофором;
- изотонический раствор хлорида натрия.

На первом этапе фиксированные мазки из взвеси микробов обрабатывают немеченой специфичной антимикробной кроличьей диагностической сывороткой. Если антитела данной сыворотки соответствуют антигену, то они фиксируются на нем. На втором этапе на препарат наносят антивидовую люминесцирующую сыворотку. Меченые вторичные антитела специфически взаимодействуют с Fc-фрагментом первичных антител, которые для вторичных антител будут являться антигенами. В результате образуется комплекс «микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флуорофором», который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе (рис. 3.24).

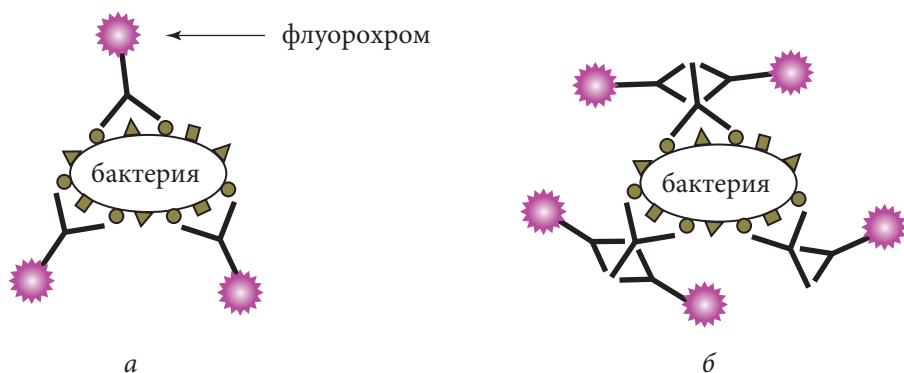


Рис. 3.24. Реакции иммунофлуоресценции:
а — прямая; б — непрямая

Преимущество непрямого метода ФИА заключается в том, что он является более универсальным по сравнению с прямым методом, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять микроорганизмы разных видов.

Непрямой метод ФИА намного чувствительнее прямого, поскольку с каждой молекулой первичных антител связываются несколько молекул вторичных антител, содержащих метку.

В настоящее время для усиления сигнала в качестве вторичных антител могут быть использованы не полные антитела, а Fab-фрагменты, конъюгированные с флуоресцентной меткой (рис. 3.25). Размер Fab-фрагментов много меньше размера полных антител, и они легче проникают к месту связывания.

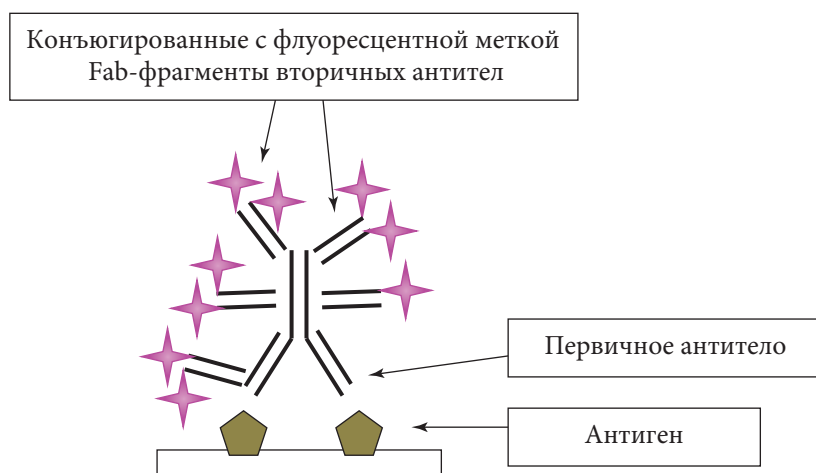


Рис. 3.25. Схема непрямого метода флуоресцентного иммунного анализа с использованием конъюгированных Fab-фрагментов вторичных антител

Использование подобной технологии позволяет многократно увеличить количество молекул флуорофора на одну молекулу антигена.

В последние годы стали применять и моноклональные люминесцирующие антитела, более специфичные по сравнению с поликлональными.

Непрямой метод ФИА можно использовать и для определения антител в сыворотке крови больного. Для этого известный антиген (культура клеток, срезы тканей) наносят на предметное стекло и инкубируют сначала с исследуемой сывороткой, а затем — в присутствии меченных флуорохромом антивидовых антител к иммуноглобулинам человека.

Непрямой метод ФИА позволяет не только обнаружить антитела, но и определить их титр. Кроме того, этим методом можно одной меченой сывороткой обнаруживать антигены разных вирусов, так как он основан на использовании антивидовых сывороток.

ФИА с комплементом представляет собой разновидность непрямого метода флуоресцентного иммунного анализа с дополнительным введением комплемента. Заключается этот метод в том, что на фиксированный препарат наносят инактивированную нефлуоресцирующую специфическую сыворотку и комплемент, выдерживают и промывают. Для выявления комплекса «антиген + антитело + комплемент» на препарат наносят флуоресцирующую антикомплемментарную сыворотку. При положительной реакции образуется комплекс «антиген + антитело + комплемент + меченые антитела». После промывки и подсушивания препарат исследуют под люминесцентным микроскопом с использованием иммерсионной системы — специального нефлуоресцирующего масла.

Достоинства флуоресцентного иммунного анализа: высокая специфичность и чувствительность, простота постановки, минимальное количество компонентов. Это экспресс-метод диагностики, так как ответ можно получить в течение нескольких часов. К недостаткам относятся субъективизм в оценке интенсивности свечения и, к сожалению, то, что иногда флуоресцирующие сыворотки бывают плохого качества. В настоящее время методы ФИА широко применяют в диагностике вирусных болезней животных.

3.2.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) является одной из разновидностей гомогенных иммунохимических методов анализа с использованием флуоресцентной метки. Основан ПФИА на конкуренции меченого флуоресцентным красителем антигена (трейсера) с немеченым антигеном (в исследуемом образце) за ограниченное количество центров связывания антител и на определении поляризации флуоресценции трейсера в составе иммунного комплекса.

Данный метод предполагает использование флуоресцентных меток, ковалентно связанных с антигеном. В качестве метки применяется, как правило, флуоресцеин, который поглощает голубой свет и флуоресцирует зеленым.

При возбуждении молекулы плоскополяризованным светом испускание флуоресцирующего образца тоже будет поляризовано. Метод ПФИА основан на возрастании поляризации флуоресценции трейсера при его связывании с антителами. Время жизни молекулы в возбужденном состоянии составляет несколько наносекунд, но его достаточно для поворота молекулы на некоторый угол. Степень поляризации обратно пропорциональна углу поворота молекул за период между возбуждением и излучением.

Время, необходимое для поворота молекулы на определенный угол, — это период вращательной релаксации. Период вращательной релаксации молекулы в растворе зависит, прежде всего, от ее размера. Он мал (1 нс) для небольших молекул (флуоресцеин) и значителен (100 нс) для крупных молекул, таких как иммуноглобулины.

Поляризация флуоресценции низкомолекулярного трейсера в растворе близка к нулю. Взаимодействие трейсера со специфическим антителом и образование иммунного комплекса значительно большего размера приводят к высокому значению степени поляризации флуоресценции (рис. 3.26).

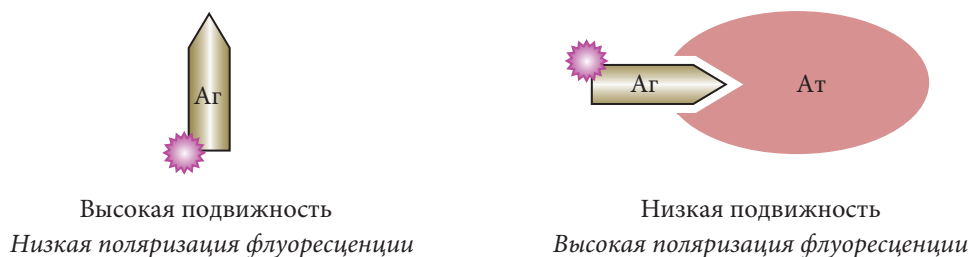


Рис. 3.26. Принцип поляризационного флуоресцентного иммуноанализа

Теоретически поляризация флуоресценции (P) изменяется от 0 до 0,5; в расчетах обычно используют величину миллиполяризации флуоресценции, mP ($P = 1000\ mP$).

При отсутствии определяемого антигена в анализируемой пробе степень поляризации флуоресценции будет максимальна, так как все центры связывания специфических антител заняты только молекулами трейсера (рис. 3.27, а).

При наличии определяемого антигена, конкурирующего за обладание активными центрами антител, степень поляризации уменьшается, потому что часть антигенсвязывающих центров антител оказывается занята антигеном без флуоресцентной метки (см. рис. 3.27, б). Следовательно, при фиксированной

концентрации антител и трейсера степень поляризации флуоресценции будет обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в пробе.

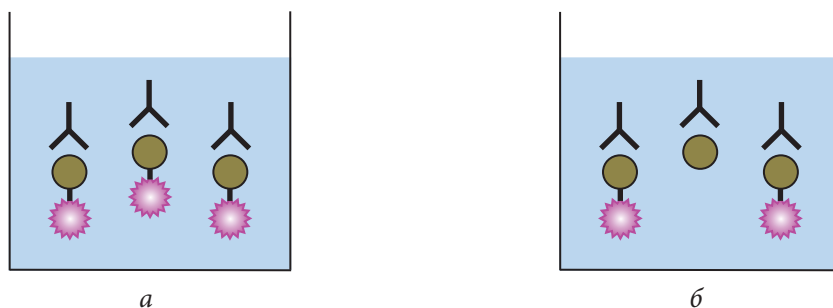


Рис. 3.27. Схема поляризационного флуоресцентного иммуноанализа: *а* — определяемый антиген в пробе отсутствует, все сайты связывания антител заняты молекулами трейсера, поляризация максимальная; *б* — определяемый антиген в пробе присутствует, сайты связывания антител заняты как молекулами трейсера, так и молекулами антигена

Метод ПФИА довольно прост в постановке и заключается в добавлении аликвоты определяемого вещества (обычно 10–50 мкл) и трейсера к раствору антител, инкубации в течение нескольких минут и измерении поляризации флуоресценции. Измерение степени поляризации флуоресценции производят на приборах, оборудованных двумя поляризаторами и высокочувствительным детектором. Принципиальная схема прибора приведена на рис. 3.28.

Специфичность в ПФИА определяют антитела. Используются антитела как моноклональные, так и поликлональные. Для рутинного скрининга подойдут высокоспецифичные поликлональные антитела. Существует возможность определять как одно соединение, так и группу соединений в зависимости от специфичности используемых антител.

Главные достоинства ПФИА — экспрессность, высокая чувствительность и специфичность, малое количество исследуемого образца, отсутствие стадий пробоподготовки, хорошая воспроизводимость результатов анализа, полная автоматизация качественного и количественного анализа. Но, как и любой аналитический метод, ПФИА имеет недостатки, а именно матричный эффект образца и необходимость использования специальных приборов. Чувствительность метода ПФИА на 1–2 порядка ниже, чем чувствительность иммуноферментного анализа с использованием одних и тех же антител. Метод ПФИА применяется для определения в основном низкомолекулярных соединений: лекарственных веществ, наркотиков, гормонов, пестицидов и др.

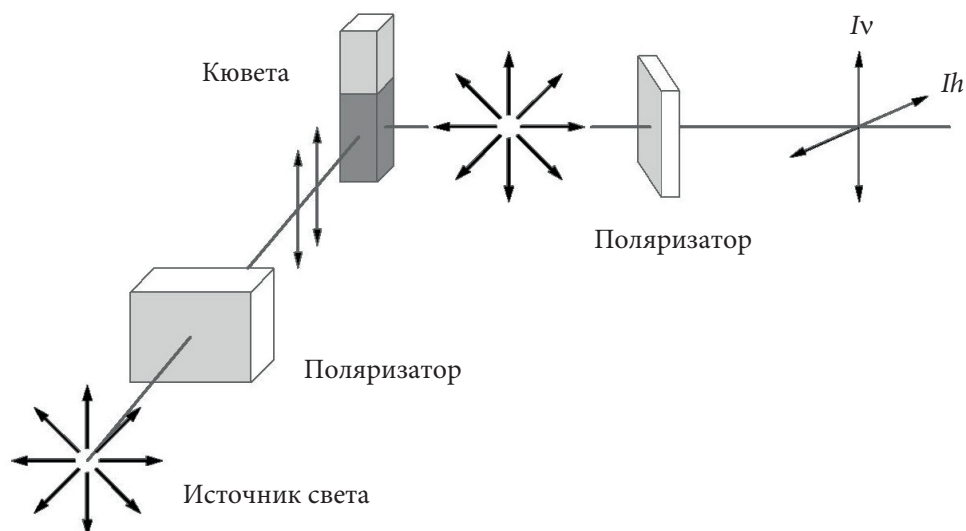
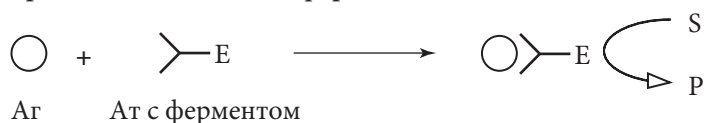


Рис. 3.28. Принципиальная схема прибора для измерения поляризации флуоресценции. Плоскополяризованный свет проходит через кювету с образцом. На выходе измеряется изменение плоскости поляризации относительно поляризатора

3.2.4. Иммуноферментный анализ

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) является высокочувствительным и высокоспецифичным иммунохимическим методом, с помощью которого проводят качественное и количественное определение различных веществ, обладающих свойствами антигенов, гаптенов или антител.

В основе метода ИФА лежат специфическая реакция антигена с антителом и выявление образовавшегося иммунного комплекса с помощью специфического иммунореагента, меченного ферментной меткой.



ИФА для выявления антигена



ИФА для выявления антител

Основной принцип иммуноферментного анализа
(Е – фермент; S – субстрат; P – продукт реакции)

Детекция иммунного комплекса осуществляется по цветной реакции субстрата этого фермента, чаще всего с помощью спектрофотометрии. Качественный анализ позволяет получить информацию о содержании антигена или антитела в исследуемом материале по принципу «есть / нет». При проведении количественного анализа определяют концентрацию антигена или антитела в исследуемом материале с использованием калибровочного графика.

Использование ферментов в качестве метки в иммуноанализе обусловлено, прежде всего, их высокой каталитической активностью, позволяющей с применением соответствующих субстратов регистрировать ферменты в растворе на уровне 10^{-15} М и ниже.

По условиям, в которых проводится ИФА, все его методы можно разделить на гомогенные и гетерогенные. Последние, в свою очередь, могут быть подразделены на твердофазные и гомогенно-гетерогенные.

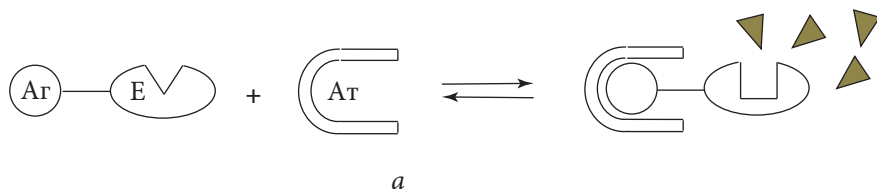
Гомогенные методы ИФА характеризуются тем, что все иммунохимические и ферментативные реакции происходят в однофазной системе (в растворе) и не требуют механического разделения и удаления промежуточных продуктов и непрореагировавших компонентов.

Определение концентрации исследуемого соединения основано на эффекте изменения каталитической активности фермента-метки при образовании иммунного комплекса. Гомогенный ИФА получил в литературе название ЕМІТ-анализ (от англ. *enzyme multiplied immunoassay technique*), или иммуноаналитический метод с регуляцией ферментативной активности.

Фермент может утрачивать каталитическую активность при его соединении с антигеном, и в результате реакции $Аг — Ат$ происходит восстановление ферментативной активности.

Чаще всего используют схему, когда конъюгат $Аг-Е$, подобно свободному ферменту, катализирует превращение субстрата S в продукт реакции P , а комплекс $Ат — Аг-Е$ не проявляет ферментативной активности.

Потеря активности может быть вызвана изменением конформации молекулы фермента с нарушением структуры его активного центра (блок *a* на приведенной ниже схеме) либо пространственной недоступностью активного центра вследствие присоединения антитела (блок *b*).





б

Причины потери активности молекулы фермента

При добавлении в систему свободного антигена он, конкурируя за антитела, количество которых ограничено, вызовет регенерацию конъюгата Аг-Е и появление ферментативной активности:



Чем больше в анализируемом образце антигена, тем больше его свяжется с антителами и тем больше конъюгата (меченных ферментом Аг) останется в растворе несвязанным и проявит ферментативную активность по отношению к субстрату, изменяя цвет раствора. Таким образом, ферментативная активность конъюгата прямо пропорциональна количеству свободного антигена в исследуемой пробе.

При наличии калибровочной кривой, отражающей зависимость между концентрацией антигена и ферментативной активностью конъюгата Аг-Е, можно определить концентрацию Аг в исследуемом образце.

Таким образом, при проведении гомогенного ИФА регистрируется концентрация не образующегося специфического комплекса Аг — Ат, а оставшихся свободными центров специфического связывания.

Гомогенный иммуноферментный анализ применяется, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций. Существенным достоинством гомогенного ИФА является экспрессность определения, которая составляет 2–5 мин. В настоящее время налажен промышленный выпуск различных тест-систем для быстрого выявления токсинов, стероидных гормонов, гаптенов, лекарственных соединений в биологических жидкостях. Недостаток данного метода — меньшая чувствительность по сравнению с гетерогенным ИФА (~1 мкг/мл).

При использовании **гетерогенных методов ИФА** анализ проводится в двухфазной системе с участием твердой фазы — носителя. Гетерогенные методы включают обязательную стадию разделения соединения свободного и соединения, образовавшего специфический комплекс меченого соединения, которые находятся в разных фазах.

Если на первой стадии антиген или антитела используют в иммобилизованном состоянии (а следовательно, формирование специфического иммунного комплекса проходит на твердой фазе), то метод относится к *твердофазным*.

Методы ИФА относятся к *гомогенно-гетерогенным*, если первая стадия — образование специфических комплексов — происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

На сегодняшний день разработано множество гетерогенных методов ИФА, различающихся по характеру применяющихся реагентов и последовательности отдельных стадий. Многообразие данных методов обусловлено в основном использованием различных комбинаций меченных ферментами и иммобилизованных на твердой фазе иммунореагентов.

Все методы ИФА можно также классифицировать **на два типа в зависимости от того, где находится ферментная метка**, активность которой регистрируется.

В методах ***I типа***, основанных на определении специфических иммунных комплексов анализируемого соединения, ферментная метка входит в состав иммунного комплекса.

В методах ***II типа*** с помощью ферментной метки выявляются оставшиеся свободными центры связывания.

Классификация методов ИФА может быть осуществлена также **по типу реагентов, используемых на первой стадии анализа**.

Если на первой стадии присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген или антитела), то метод является ***неконкурентным***.

Для ***неконкурентного анализа I типа*** оптимальным является соотношение компонентов, при котором концентрация центров связывания значительно превышает концентрацию определяемого соединения. В этом случае равновесие $Ag + At \rightleftharpoons Ag - At$ будет смещаться вправо. Количество образующихся иммунных комплексов возрастает, что обуславливает высокую чувствительность и точность определения концентрации комплексов.

В ***неконкурентном анализе II типа*** определяется разность общего числа мест связывания и числа образовавшихся иммунных комплексов. В этом случае необходимо, чтобы концентрация определяемого соединения была сравнима с количеством мест связывания или превышала его. Если концентрация иммунных комплексов мала по сравнению с общим числом возможных мест связывания, то она будет определяться как разность двух близких чисел, каждое из которых находится с определенной ошибкой и поэтому не имеет достаточной точности.

Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания, то метод является ***конкурентным***. Необходи-

мое условие конкурентного метода — недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога. В противном случае каждый из процессов образования иммунокомплексов может происходить независимо от другого, следовательно определяемая концентрация метки не будет зависеть от концентрации анализируемого соединения в растворе.

Таким образом, классификация методов ИФА может быть представлена схемой, приведенной на рис. 3.29.

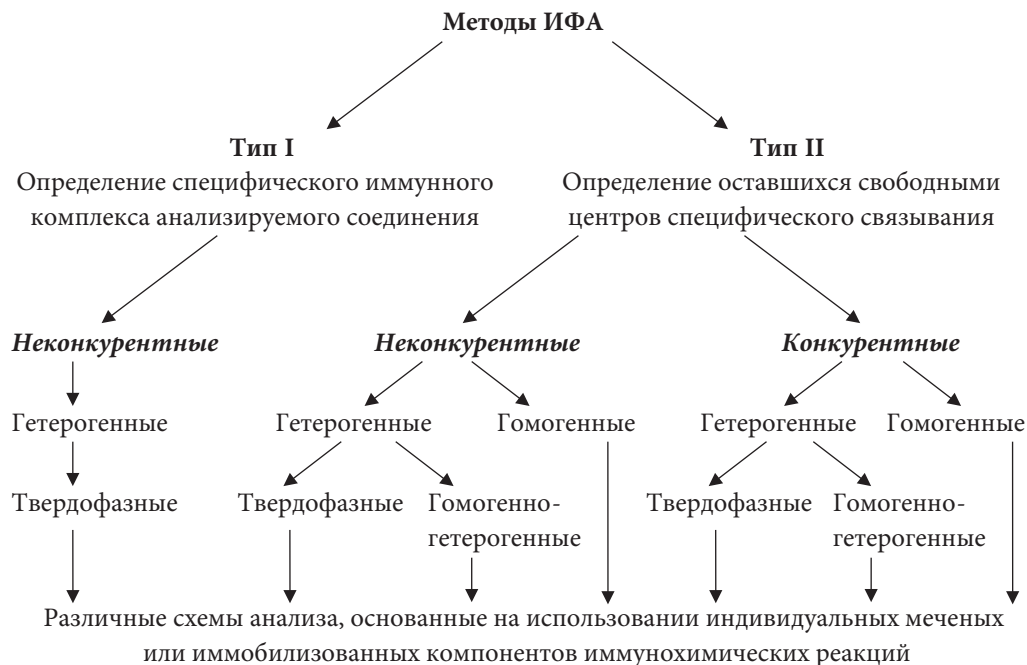


Рис. 3.29. Классификация методов иммуноферментного анализа

Методы ИФА типа I

Гетерогенные методы ИФА-определения антигенов, основанные на выявлении специфических иммунных комплексов

Методы, относимые к этой группе, являются неконкурентными.

Метод с использованием меченных ферментом специфических антител и иммобилизованных антител

1. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе первой инкубации на твердой фазе образуется специфический комплекс $Ag - Ab$.

2. Носитель отмывают от несвязавшихся молекул антигена и добавляют меченные ферментом антитела (конъюгат).

3. Во время вторичной инкубации происходит связывание конъюгата с антигеном в составе иммунного комплекса.

4. Затем опять следует отмывка для удаления избытка конъюгата.

5. Завершающая стадия — определение ферментативной активности по степени превращения хромогенного субстрата.

Этот метод получил название сэндвич-метода, поскольку антиген в составе комплекса оказывается зажатым между молекулами иммобилизованного и меченого антител (рис. 3.30). В литературе встречается и другое его название — двухцентровой метод ИФА.

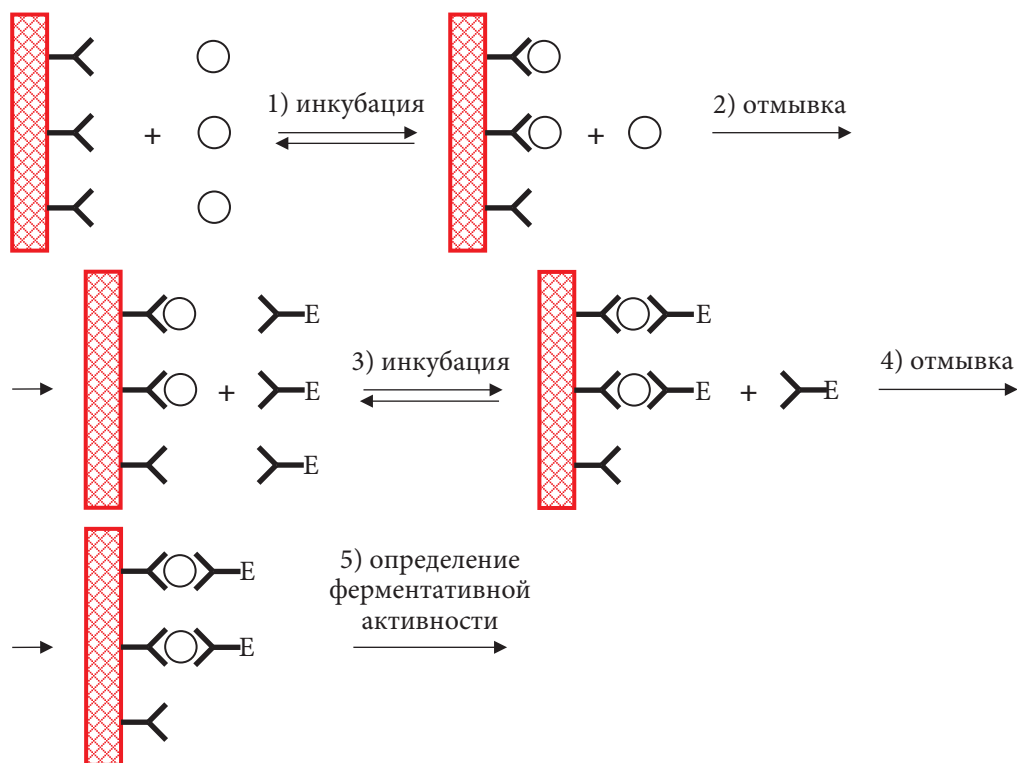


Рис. 3.30. Схема ИФА-определения антигенов с использованием меченных ферментом специфических антител и иммобилизованных антител (сэндвич-метод)

Достоинством сэндвич-метода является его высочайшая чувствительность по сравнению с другими методами ИФА. Предел обнаружения соединений с помощью данного метода достигает 10^{-21} моль/л.

Сэндвич-метод ИФА может быть использован для выявления только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, два эпитопа. Для определения гаптенов (лекарственных веществ, пестицидов, стероидных гормонов и др.) этот метод неприемлем.

Данный метод ИФА требует продолжительного времени (4–6 ч), так как состоит из нескольких последовательных операций.

Упрощенный метод с использованием меченных ферментом специфических антител и иммобилизованных антител

Сэндвич-метод методически упрощается, если анализируемый антиген и меченые антитела добавлять к иммуносорбенту одновременно (рис. 3.31).

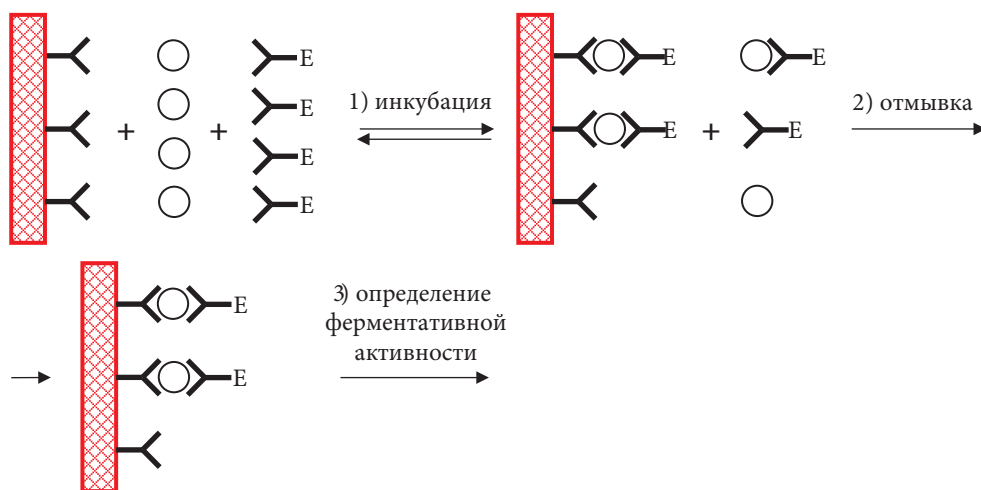


Рис. 3.31. Схема ИФА-определения антигенов с использованием меченных ферментом специфических антител и иммобилизованных антител (упрощенный сэндвич-метод)

Иногда в литературе эта схема называется одностадийным сэндвич-вариантом. Чувствительность одностадийной схемы ниже, чем чувствительность двухстадийной, а контакт фермента с анализируемой средой может неблагоприятно отражаться на результатах анализа. Данная схема налагает дополнительные требования на соотношение концентраций меченых и иммобилизованных антител с целью исключения их конкуренции за связывание с ограниченным числом эпитопов на молекуле антигена, поэтому целесообразным является использование в анализе моноклональных антител, специфичных к разным эпитопам антигена.

Усложненный метод с использованием меченых антивидовых антител и иммобилизованных специфических антител

Это усложненный вариант обычного сэндвич-метода, в котором образование комплекса детектируется не непосредственно введением в него меченого ферментом антитела, а с помощью содержащих ферментную метку антивидовых антител. В качестве антивидовых (или вторичных) антител используют

антитела, специфичные к глобулинам тех видов животных или птиц, которых иммунизировали антигеном для получения антисыворотки (рис. 3.32).

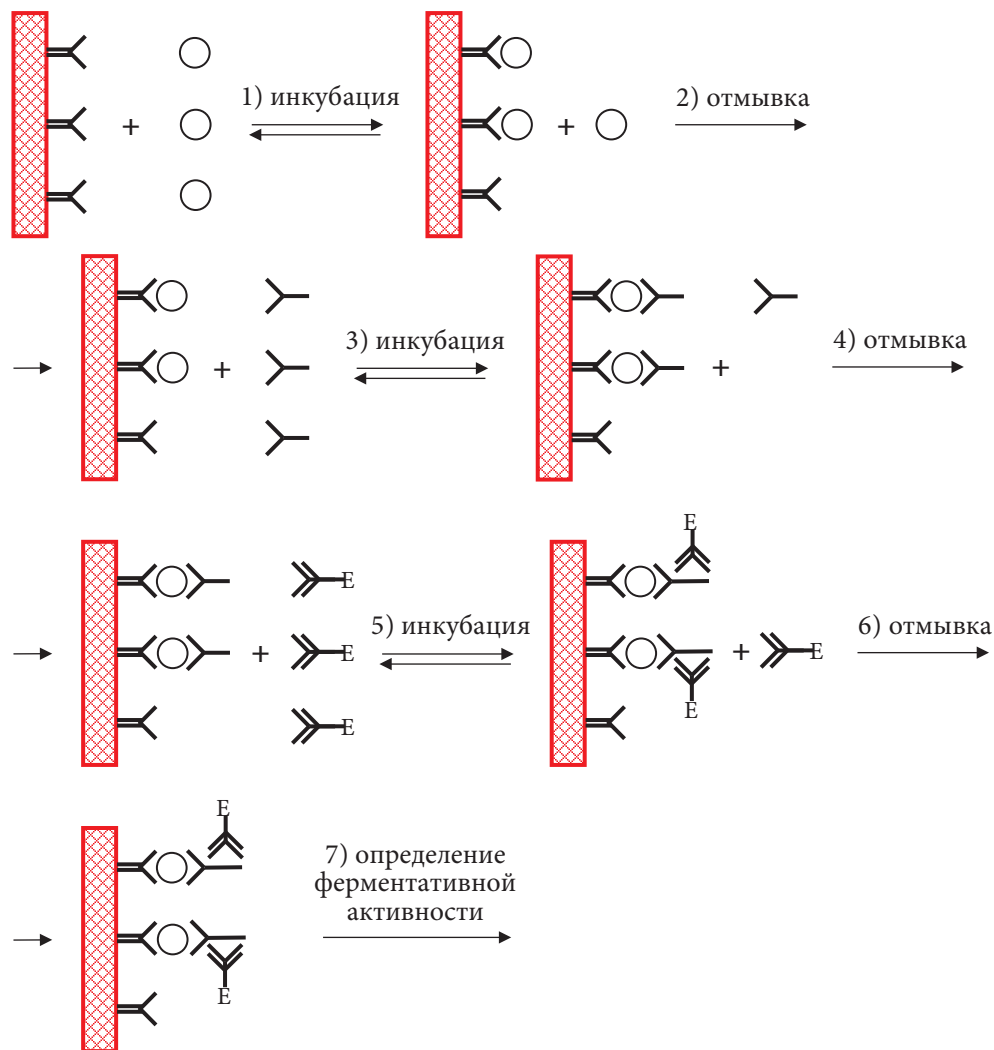


Рис. 3.32. Схема ИФА-определения антигенов с использованием меченых антивидовых антител и иммобилизованных специфических антител (усложненный сэндвич-метод)

Примером наиболее распространенных «антивидовых» конъюгатов являются меченные ферментом антитела кролика против иммуноглобулинов человека, меченые антитела козы (барана, осла и т. д.) против иммуноглобулинов кролика и т. д.

Для того чтобы меченые «антивидовые» антитела не связывались с антителами, иммобилизованными на поверхности, необходимо использовать при

образовании сэндвич-комплекса антитела, полученные от животных разных видов. Несмотря на многостадийность и длительность проведения, достоинством данного метода является универсальность антивидового конъюгата, который может быть применен для анализа различных антигенов.

Гетерогенные методы ИФА-определения антител, основанные на выявлении специфических иммунных комплексов

Так же, как в случае анализа антигенов, все методы определения антител, относящиеся к методам ИФА типа I, являются неконкурентными.

Метод с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованных антигенов. К иммобилизованному антигену добавляют исследуемую сыворотку и после инкубации и удаления несвязанных компонентов проводят выявление специфических иммунокомплексов с помощью меченных ферментом антивидовых антител (непрямой метод) (рис. 3.33).

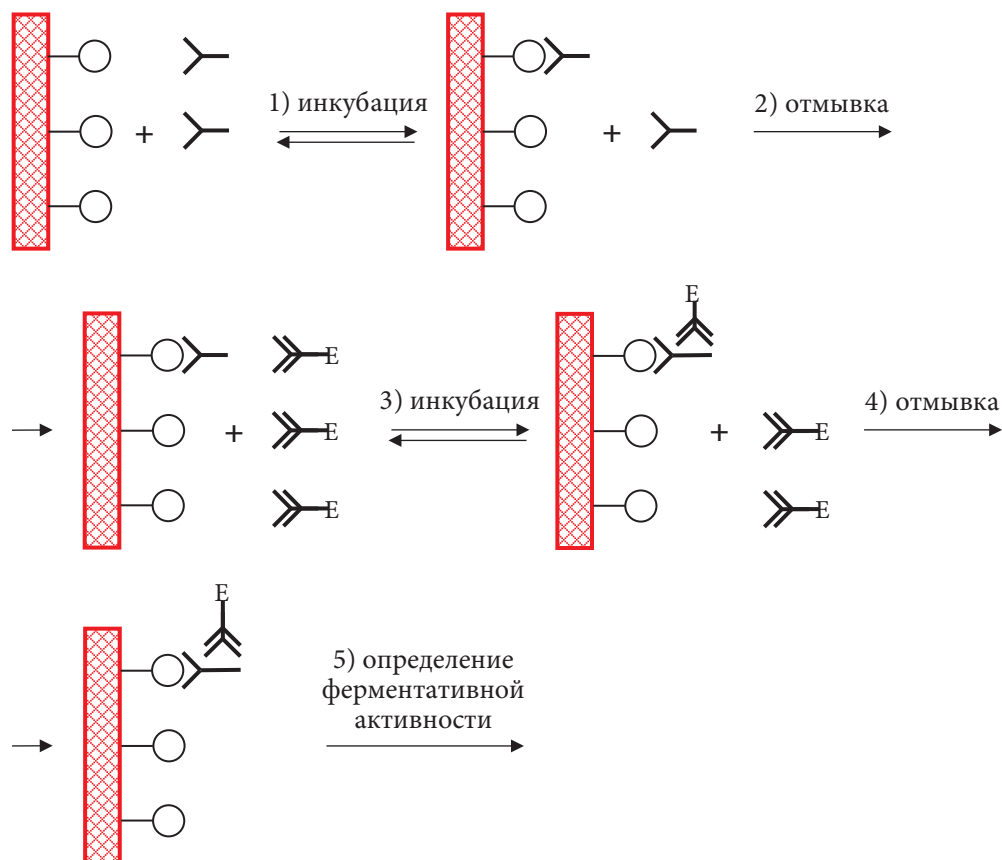


Рис. 3.33. Схема ИФА-определения антител с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованных антигенов (непрямой метод)

Измеряемое на носителе содержание ферментной метки пропорционально концентрации специфических антител в сыворотке.

Данная схема является одной из наиболее распространенных в иммуноферментном анализе антител, так как обладает всеми достоинствами сэндвич-метода, но отличается от него универсальностью меченого реагента, что дает возможность выявлять антитела к разным антигенам. Такой подход позволяет решать проблемы серодиагностики заболеваний человека и животных, используя ограниченный набор антивидовых иммуноферментных конъюгатов, что значительно облегчает задачу производства реагентов для ИФА.

Метод с использованием меченого антигена и иммобилизованного антигена. Исследуемую пробу инкубируют с иммобилизованным антигеном и после отмывки несвязавшихся компонентов для выявления образовавшегося иммунного комплекса проводят инкубацию с меченым ферментом антигеном. За этим следует выявление образовавшихся на первой стадии иммунохимических комплексов с помощью ферментативной реакции (рис. 3.34).

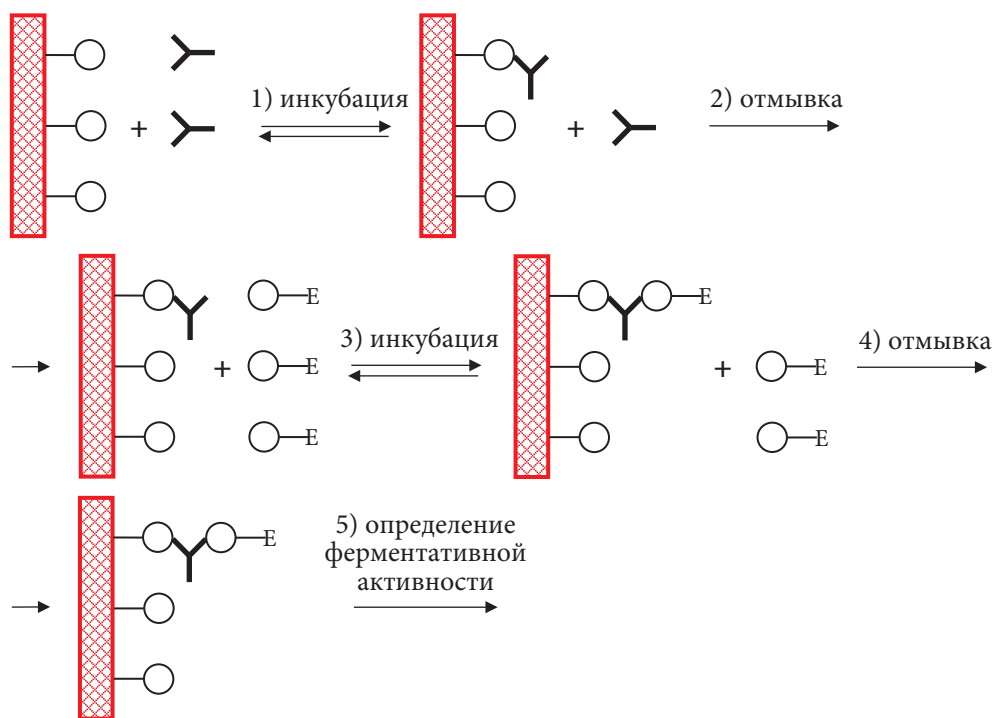


Рис. 3.34. Схема ИФА-определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованного антигена

Метод с использованием меченого антигена и иммобилизованных антивидовых антител. На первой стадии иммобилизованные антивидовые антитела связывают из раствора все антитела соответствующего вида (рис. 3.35). Наличие в образовавшихся иммунохимических комплексах антител определенной специфичности выявляют титрованием антигенсвязывающих центров конъюгатом соответствующего антигена с ферментом. Метод основан на выявлении из множества связавшихся с иммуносорбентом антител молекул только одной специфичности, поэтому возможность его эффективного применения снижается при способности меченого антигена к неспецифическому связыванию с иммобилизованными на носителе белками или адсорбировавшимися на них после первой инкубации иммуноглобулинами.

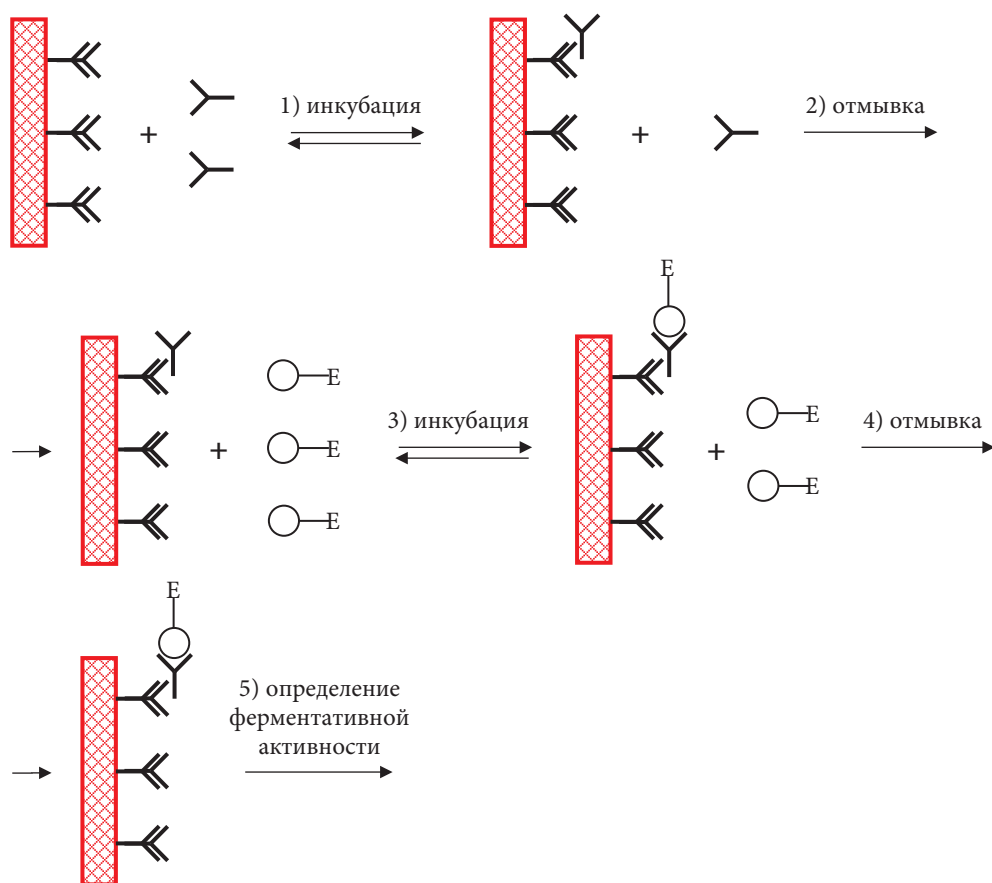


Рис. 3.35. Схема ИФА-определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованных антивидовых антител

В методах ИФА типа I возрастание концентрации анализируемого соединения будет сопровождаться увеличением концентрации образующегося им-

мунного комплекса и, как следствие, более высоким регистрируемым сигналом. Калибровочный график, представляющий собой зависимость регистрируемого сигнала от концентрации анализируемого соединения, должен описываться возрастающей функцией (рис. 3.36).

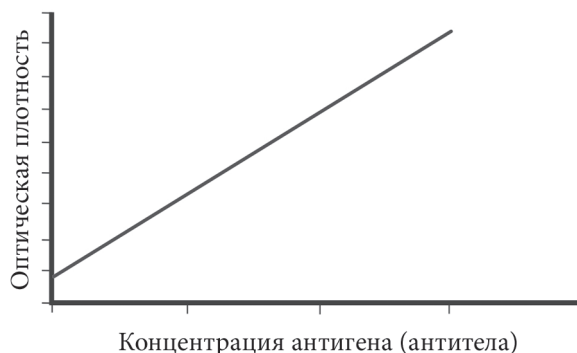


Рис. 3.36. Калибровочный график зависимости уровня регистрируемого сигнала от концентрации анализируемого вещества для определения специфического иммунного комплекса анализируемого соединения

Методы ИФА типа II

Гетерогенные методы ИФА-определения антигена, основанные на выявлении оставшихся свободными центров специфического связывания

По сравнению с методами ИФА типа I эти методы многочисленны и включают как неконкурентные, так и конкурентные подходы, причем каждый из них в зависимости от того, какой реагент используется на первой стадии (иммобилизованный или растворимый), подразделяется на твердофазный или гомогенно-гетерогенный.

Неконкурентные методы

Метод определения антигенов с использованием меченых специфических антител и иммобилизованного антигена. Метод является гомогенно-гетерогенным, поскольку на первой стадии анализируемый образец смешивают с раствором, содержащим фиксированное количество меченных ферментом специфических антител (рис. 3.37). После инкубации и образования специфических иммунокомплексов в систему вводят избыток иммобилизованного антигена, который сорбирует оставшиеся не связанными меченые антитела. После отмывки определяют ферментативную активность на носителе. В литературе этот метод иногда называют иммуноферментометрическим.

С иммобилизованным антигеном могут связываться не только свободные меченые антитела, но и антитела, провзаимодействовавшие с антигеном только одним активным центром, особенно в случае антигена малых размеров. Это

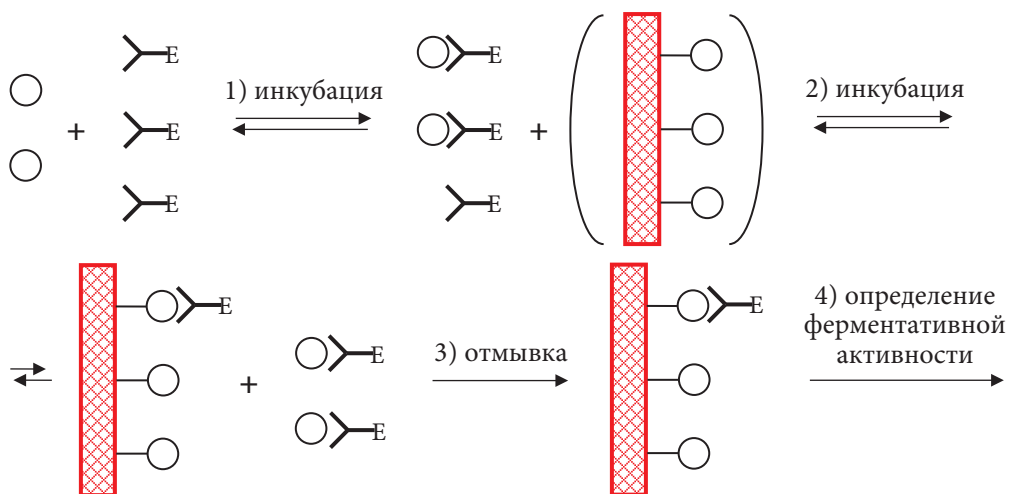


Рис. 3.37. Схема неконкурентного ИФА-определения антигенов с использованием меченых специфических антител и иммобилизованного антигена

следует учитывать при определении конкретных соединений. Другим недостатком данного метода является контакт ферментной метки с анализируемым образцом, что может вызвать изменение ферментативной активности.

Метод определения антигенов с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованного антигена. Данный метод тоже является гомогенно-гетерогенным и имеет сходные черты с иммуноферментометрическим методом (рис. 3.38). Отличие его заключается в том, что на первой стадии используют немеченые специфические антитела, а образующийся на твердой фазе комплекс выявляют с использованием меченых вторичных антител.

По сравнению с предыдущим методом данный метод более длительный, но в нем исключается контакт исследуемой жидкости с ферментной меткой; кроме того, можно использовать один и тот же антивидовой конъюгат для анализа различных антител.

Метод определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител (метод последовательного насыщения). Данный метод относится к твердофазным. Иммобилизованные антитела инкубируют с раствором, содержащим определяемый антиген. После отмывки к носителю добавляют меченый ферментом антиген, который взаимодействует со свободными антигенсвязывающими центрами антител (рис. 3.39).

Длительность этого анализа обусловлена в основном длительностью первой стадии, которую целесообразно проводить в равновесном режиме. Рассматриваемый метод позволяет предотвратить влияние биологической жидкости на активность фермента, так как вторая стадия проводится после отмывки иммуносorbента.

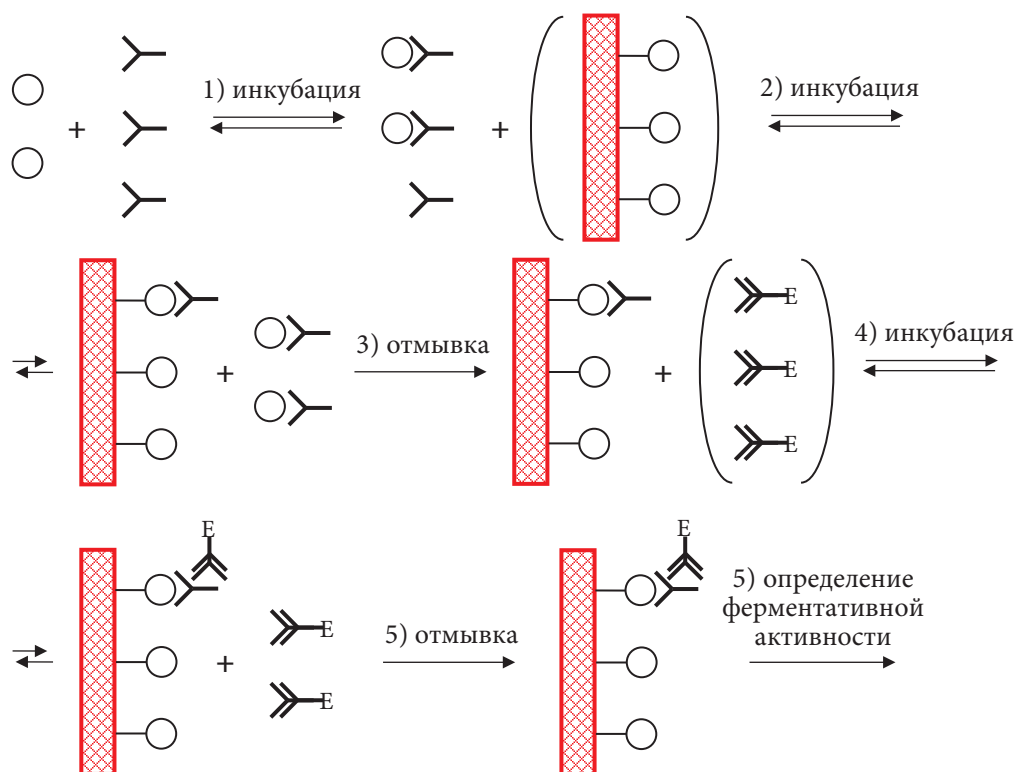


Рис. 3.38. Схема неконкурентного ИФА-определения антигенов с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованного антигена

Конкурентные методы

Метод определения антигенов с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена. К носителю с иммобилизованным антигеном добавляют раствор определяемого антигена и раствор, содержащий фиксированное количество меченных ферментом специфических антител. После инкубации и отмывки не связавшихся с носителем компонентов определяют ферментативную активность на носителе. Время анализа зависит в основном от продолжительности инкубации (рис. 3.40).

Поскольку в данном случае фермент-маркер контактирует с анализируемой средой, это может ограничивать применение рассматриваемого метода для анализа биологических жидкостей (сыворотки крови, экстрактов тканей и т. п.), способных оказывать ингибирующее или активирующее действие на фермент или на содержащие эндогенный фермент вещества. Данный метод иногда называют ингибиторным ИФА.

Метод определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител. К иммобилизованным на носителе антителам

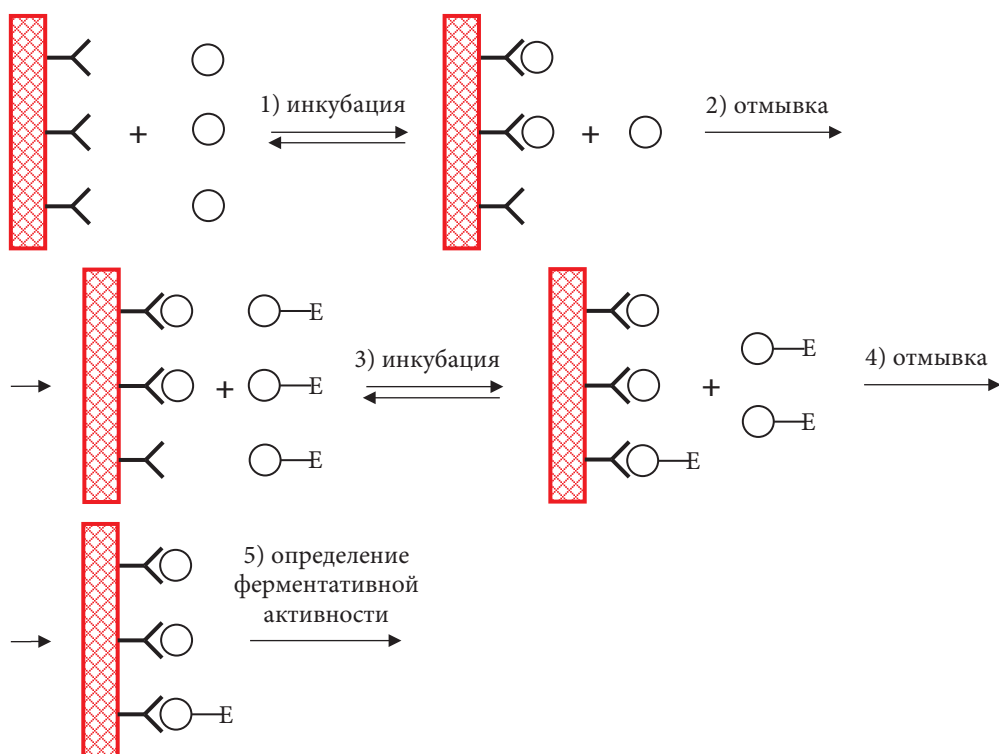


Рис. 3.39. Схема неконкурентного ИФА-определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител (метод последовательного насыщения)

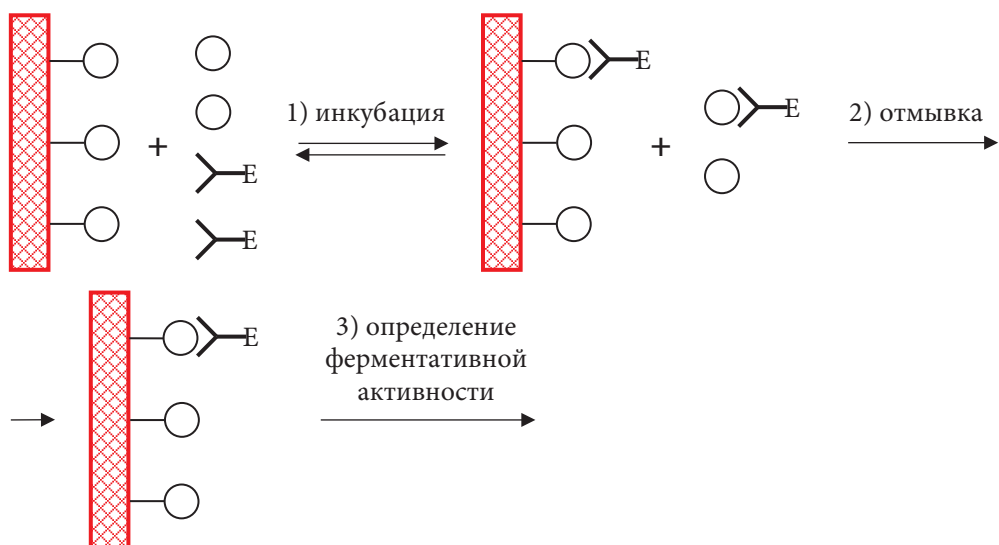


Рис. 3.40. Схема конкурентного ИФА-определения антигенов с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена (ингибиторный ИФА)

добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген и фиксированную концентрацию меченых антигенов. После инкубации несвязанные свободные и меченые антигены отмывают и регистрируют ферментативную активность на носителе (рис. 3.41).

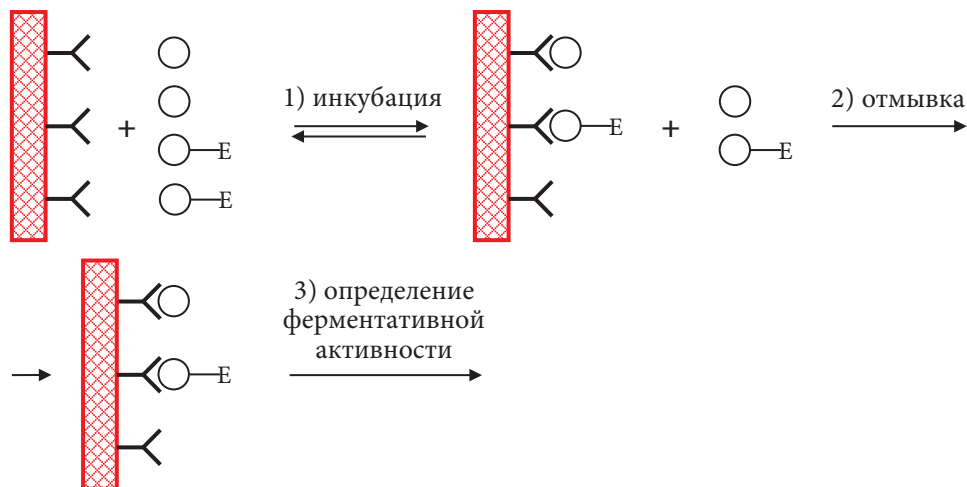


Рис. 3.41. Схема конкурентного ИФА-определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител

К преимуществам данного метода следует отнести небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. Недостатками являются сложность получения антигенных конъюгатов, особенно низкомолекулярных, и возможное влияние компонентов анализируемой биологической жидкости на активность фермента в конъюгате.

Гомогенно-гетерогенный метод ИФА-определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных вторичных антител. Первая стадия взаимодействия специфических антител с определяемым и меченым антигенами происходит в растворе. После установления в системе равновесия в раствор добавляют носитель с иммобилизованными вторичными антителами, которые сорбируют образовавшиеся на первой стадии иммунные комплексы. После проведения отмывки несвязавшихся компонентов определяют ферментативную активность на носителе (рис. 3.42).

В литературе этот метод часто называют методом двойных антител.

Гетерогенные методы ИФА-определения антител, основанные на выявлении оставшихся свободными мест специфического связывания

К этой группе относятся два метода, один из них — неконкурентный, второй — конкурентный.

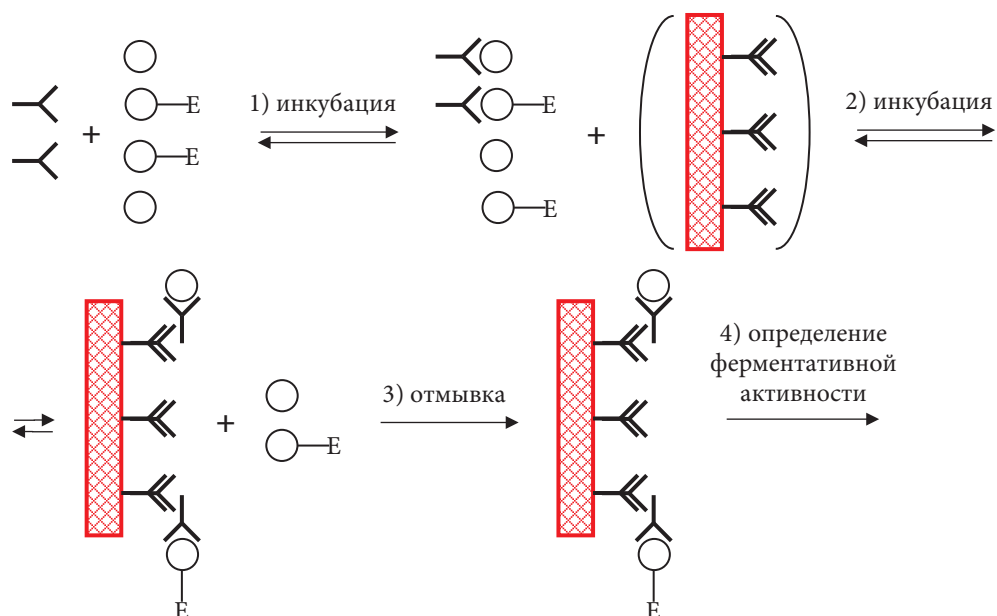


Рис. 3.42. Схема ИФА-определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных вторичных антител (метод двойных антител)

Неконкурентный метод ИФА-определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена. К носителю с иммобилизованным антигеном добавляют анализируемый раствор. После установления в системе равновесия и частичного связывания анализируемых антител с носителем несвязанные антитела отмывают. Затем добавляют меченые антитела той же специфичности, которые взаимодействуют с оставшимися несвязанными антигенами на носителе (рис. 3.43).

Конкурентный метод ИФА-определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена. К иммобилизованному антигену добавляют анализируемый раствор, содержащий фиксированное количество меченных ферментом антител. После установления в системе равновесия несвязавшиеся компоненты отмывают и определяют ферментативную активность на носителе.

Необходимым условием проведения анализа является нахождение иммобилизованного антигена в недостатке по отношению к суммарному количеству свободных и меченых антител в растворе. Так же, как и в отношении всех конкурентных методов, не исключается контакт ферментной метки с компонентами биологической жидкости, что накладывает дополнительные условия на выбор фермента (рис. 3.44).

Для методов ИФА, основанных на определении свободных центров специфического связывания, калибровочная кривая описывает уменьшение регис-

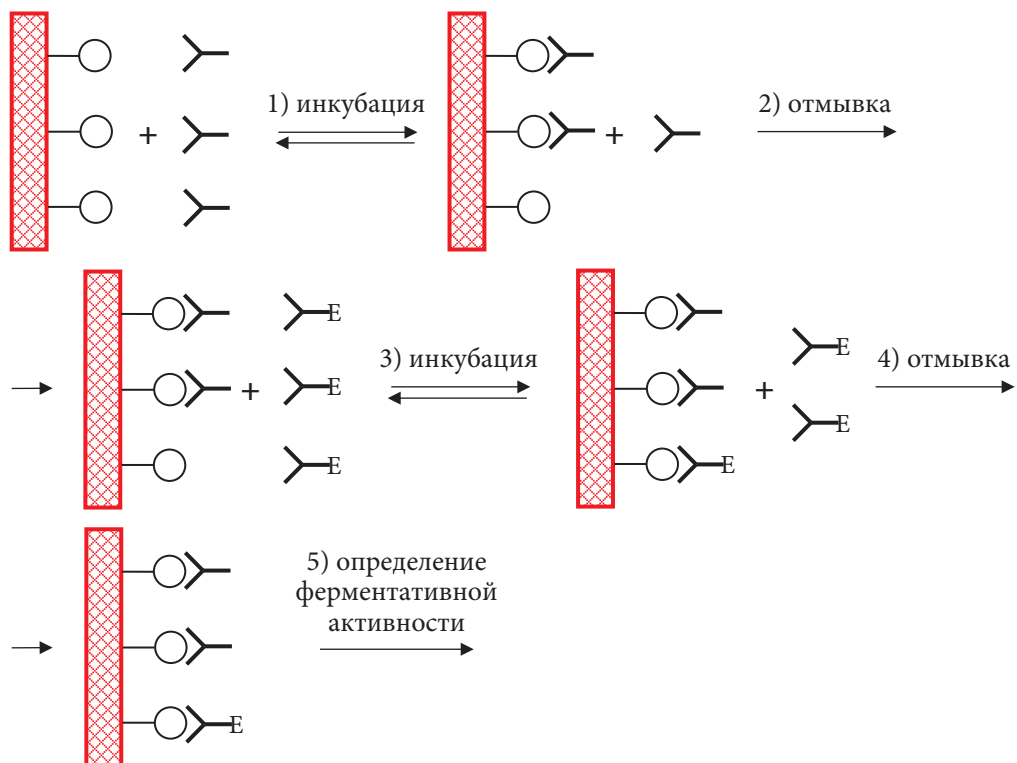


Рис. 3.43. Схема неконкурентного ИФА-определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена

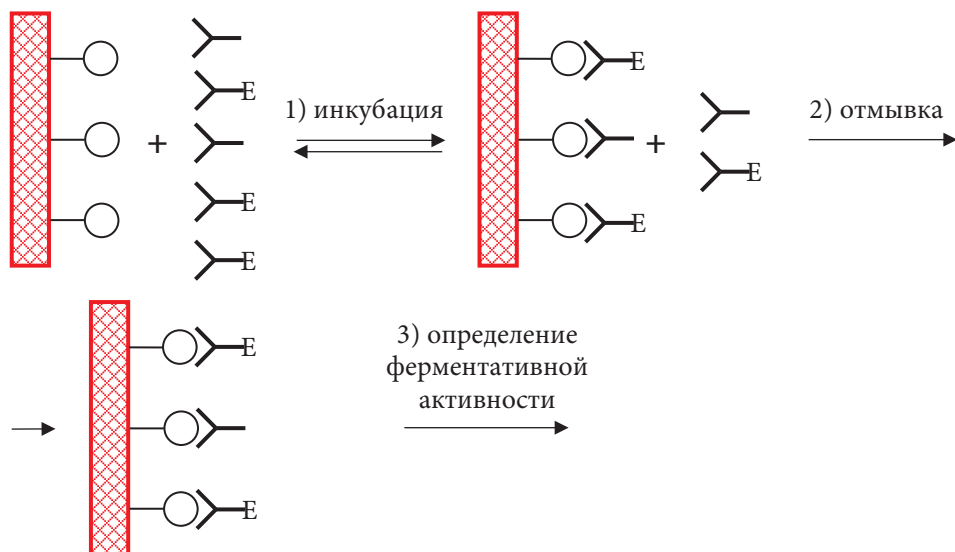


Рис. 3.44. Схема конкурентного ИФА-определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена

трируемого сигнала от максимального значения, соответствующего нулевой концентрации антигенов до определенного уровня, характеризующего концентрацию исследуемого антигена (рис. 3.45).



Рис. 3.45. Калибровочный график зависимости уровня регистрируемого сигнала от концентрации анализируемого вещества для определения оставшихся свободных центров специфического связывания

Особенности схем проведения гетерогенных методов ИФА

Гетерогенные методы ИФА имеют как достоинства, так и недостатки. Несмотря на разнообразие этих методов, универсального метода для определения любых соединений не существует. Выбор метода анализа зависит от ряда факторов, из которых основными являются:

- молекулярная масса и валентность антигена;
- длительность анализа;
- состав исследуемой среды;
- свойства ферментов.

Для получения конъюгатов необходимо выделить достаточное количество антигена в очищенном виде, что не всегда осуществимо.

Разнообразие строения и физико-химических свойств антигенов не позволяет разработать универсальный способ введения ферментной метки в молекулу антигена. Проблема усложняется по мере уменьшения его молекулярной массы и растворимости. По сути, получение большинства антигенферментных конъюгатов всякий раз представляет собой самостоятельную конкретную задачу.

Основной проблемой, стоящей особенно остро при введении ферментной метки в низкомолекулярные соединения, является доступность антигенных детерминант в образовавшемся конъюгате для взаимодействия с антителами. При использовании меченых гаптенa необходимо, чтобы связь фермента с ним осуществлялась через ту же функциональную группу, которая была задействована при синтезе конъюгата гаптена с белком для целей иммунизации

животного при получении специфических антител. Это предъявляет дополнительные требования к выбору фермента-маркера.

Получение меченых антител — более простая задача. Методы синтеза и очистки конъюгатов с различными иммуноглобулинами в настоящее время хорошо разработаны и унифицированы. С помощью имеющихся стандартных методик получают активные и стабильные препараты, что упрощает разработку методов иммуноферментного анализа различных соединений.

Вместе с тем на ряд антигенов трудно подобрать высокоаффинные антитела. К тому же получение меченых специфических антител в количествах, обеспечивающих потребности массового анализа, затрудняется многообразием антигенов.

В связи с этим применение в анализе меченых антивидовых антител упрощает процедуру получения реагентов для анализа, так как позволяет, используя одни и те же конъюгаты, осуществлять определение разных антигенов и антител разной специфичности.

При сравнении конкурентных и неконкурентных методов можно отметить следующее. Во-первых, конкурентные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений неконкурентными методами ограничен только чувствительностью регистрации ферментной метки, а для конкурентных методов — еще и аффинностью антител. Во-вторых, еще одним недостатком конкурентных методов иммуноферментного анализа является возможное влияние компонентов анализируемых биологических жидкостей на каталитические свойства ферментной метки. Во многих случаях подобный эффект может быть устранен путем многократного разведения исходного образца. Однако возможность его разведения зависит от содержания исследуемого соединения, что должно быть устранено при выборе метода ИФА.

3.2.5. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (от англ. *blot* — промокать, пятно) — это разновидность гетерогенного иммунного анализа, высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

В общем смысле под иммуноблоттингом понимают анализ смеси белков, перенесенных на твердую подложку-мембрану, способную их иммобилизовать, методом иммунодетекции. Как по назначению, так и по способу исполнения к иммуноблоттингу хорошо подходит известное выражение «вывести на промокашку». Смесь белков, предварительно подвергнутая разделению с помощью электрофореза на полиакриламидном геле, переносится на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану («промокашку»).

Процедура иммуноблоттинга состоит из нескольких этапов (рис. 3.46).

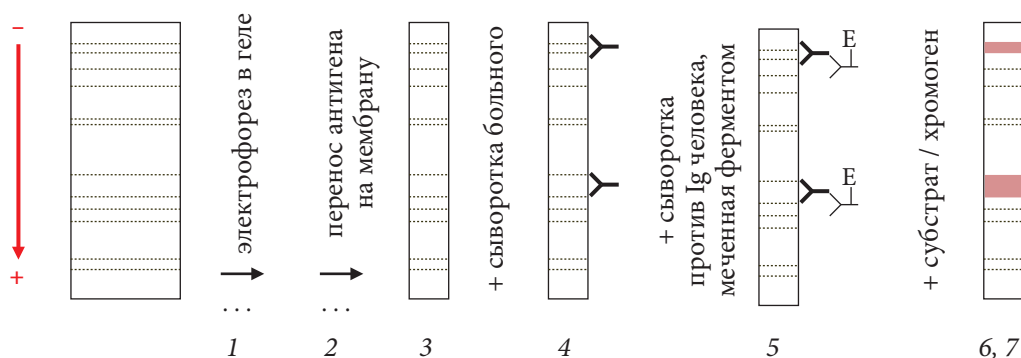


Рис. 3.46. Этапы постановки иммуноблоттинга:

1 — разделение антигенов электрофорезом (пропорционально размеру); 2 — перенос антигенов на мембрану; 3 — разрезание мембраны на блоты (полоски, содержащие спектр антигенов); 4 — обработка блота исследуемой сывороткой (специфические антитела связываются с соответствующими антигенами); 5 — выявление связавшихся антител антивидовыми антителами, меченными ферментом; 6 — внесение субстрата и проявление блотов (при связывании специфических антител в месте связывания образуется пятно); 7 — учет реакции (сравнение результата с положительным и отрицательным контролями)

На первом этапе исследуемую смесь белков (например, белков сыворотки крови) разделяют по их молекулярной массе и заряду методом электрофореза в геле.

На втором этапе на гель накладывают мембрану из нитроцеллюлозы, поливинилидендифторида или положительно заряженную нейлоновую мембрану и промокают (это и есть блоттинг). Перенос белков на мембрану осуществляют в специальной камере либо пассивно, либо с использованием аппаратуры для электропереноса. На эффективность переноса белков на мембрану влияет множество факторов: молекулярная масса белков, пористость геля, время переноса и состав используемого буферного раствора (транс-буферов). В зависимости от задачи подбирают условия, обеспечивающие наилучшие результаты. В итоге картина расположения белков на геле воспроизводится на мембране (блоте).

После иммобилизации антигена на мембране оставшиеся центры связывания блокируют растворами желатина, бычьего сывороточного альбумина или обезжиренным молоком. Затем мембрану разрезают на блоты (этап 3) и инкубируют в растворе поли- или моноклональных антител, специфичных к определяемому антигену (этап 4). Далее мембрану отмывают от несвязавшихся антител и инкубируют в растворе вторичных антител, которые представляют собой конъюгат ферментов щелочной фосфатазы или пероксидазы хрена с антивидовыми антителами (козьи антитела к иммуноглобулинам мыши, кролика или человека) либо белками А (белок *Staphylococcus aureus*) или G (белок *Streptococcus sp.*), высокоаффинных к Fc-фрагментам иммуноглобулинов (этап 5).

На этапе 6 образовавшийся на полоске комплекс (Аг – Ат + Ат против Ig человека) выявляют добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента. Субстратами для химической реакции при использовании конъюгатов щелочной фосфатазы служат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат или тетразолий голубой, а при использовании конъюгатов пероксидазы хрена — 4-хлор-1-нафтол и пероксид водорода. В результате ферментативной реакции на мембране образуется окрашенная полоса или пятно в месте локализации иммунного комплекса.

На заключительном (седьмом) этапе сравнивают полученный результат с положительным и отрицательным контролями.

Иммуноблоттинг применяют:

- для подтверждения результатов других серологических реакций;
- идентификации бактериальных или вирусных белков;
- идентификации микробов;
- для научных целей.

Наибольшее распространение метод иммуноблоттинга получил как метод, пригодный для использования в качестве теста подтверждения. Так, по рекомендации ВОЗ иммуноблоттинг используется при диагностике ВИЧ-инфекции в качестве дополнительного экспертного метода, который должен подтверждать положительный результат ИФА. Иммуноблот позволяет выявлять антитела к отдельным структурным белкам ВИЧ (белки — р24, гликопротеины — gp120, gp41 и др.). Уникальность иммуноблоттинга заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов. Однако он не может использоваться для массового скрининга вследствие высокой стоимости, это метод индивидуального арбитража на заключительном этапе серологического исследования. Материалом для исследования являются сыворотка или плазма крови человека.

По рекомендациям ВОЗ положительными считаются сыворотки, в которых методом иммуноблоттинга обнаруживаются антитела к каким-либо двум белкам оболочки ВИЧ. Согласно этим рекомендациям при наличии реакции только с одним из белков оболочки (gp160, gp120, gp41) результат считается сомнительным, и нужно проводить повторное исследование с использованием набора другой серии или другой фирмы (рис. 3.47).

Реакция проводится в несколько этапов.

1. Вирус разрушают на компоненты — антигены (р24, gp120, gp41 и др.), которые подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле, то есть разделяют на фракции по молекулярной массе.

2. Гель покрывают нитроцеллюлозной мембраной, и на нее при помощи электрофореза переносятся фракции антигенов. Нитроцеллюлоза ведет себя подобно промокательной бумаге. Мембрану разрезают на полоски (стрипы).

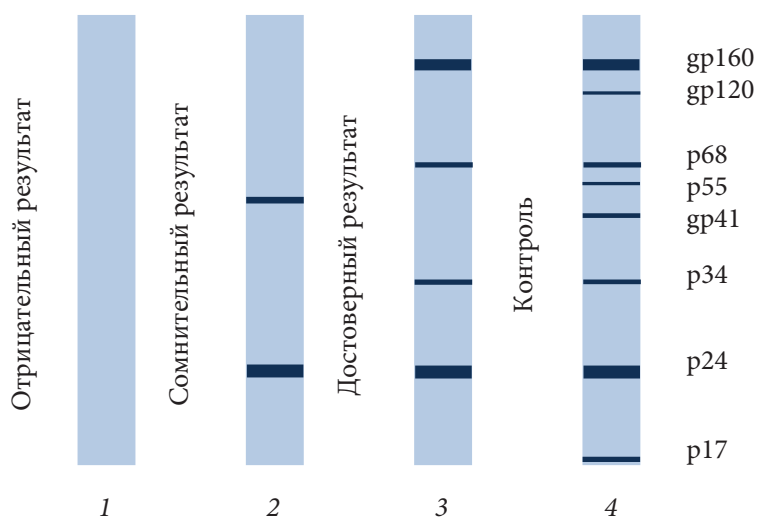


Рис. 3.47. Результат реакции иммуноблоттинга:

1, 2, 3 — полосы, вдоль которых распределились антигены ВИЧ исследуемых образцов;
4 — контрольная полоска (р — протеины, гр — гликопротеины)

В настоящее время фирмы выпускают наборы, содержащие готовые полоски с «блотами» антигенов.

3. Стрипы с нанесенными на них антигенами ВИЧ погружают в сыворотку обследуемого и затем отмывают от несвязавшегося материала.

4. Стрипы инкубируют с конъюгатом (антиглобулиновой сывороткой, меченной пероксидазой) и отмывают.

5. Добавляют субстрат и отмечают число окрашенных фракций (пятен), которые соответствуют зоне локализации комплекса Аг — Ат.

3.2.6. Иммунохроматографический анализ

К иммунохимическим методам относится и иммунохроматографический анализ (ИХА), основанный на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между антигеном и соответствующим ему антителом в биологических материалах.

Иммунохроматографический анализ — качественный скрининговый предварительный метод, позволяющий быстро, в течение нескольких минут, выявить наличие определенных веществ в биологических материалах (моче, цельной крови, сыворотке или плазме крови, слюне и т. д.) в любых условиях, в том числе «полевых».

Это сравнительно молодой метод анализа; в литературе он часто обозначается также как метод сухой иммунохимии, стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick, экспресс-тест или экспресс-анализ. Эти названия связаны с быстротой проведения ИХА.

Осуществляется иммунохроматографический анализ при помощи индикаторных полосок, палочек, панелей или тест-кассет, которые обеспечивают быстроту проведения тестирования.

Так же, как и ИФА, данный метод имеет несколько вариантов. Наиболее распространены два: прямой ИХА (сэндвич-метод) и непрямой конкурентный ИХА.

Прямой ИХА (сэндвич-метод). На мембране с конъюгатом находятся «высушенные» меченые моноклональные антитела, специфичные к определяемому антигену. В тестовой зоне — поликлональные антитела, специфичные к другим эпитопам антигенов. В контрольной зоне — антивидовые антитела, специфичные к первичным антителам.

При попадании образца, содержащего определяемый антиген, на мембрану с конъюгатом происходит связывание антигена с мечеными антителами. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он связывается со специфическими антителами, образуя «сэндвич» Ат — Аг — Ат — метка. Избыток свободного конъюгата связывается с антивидовыми антителами в контрольной зоне. Таким образом, появление двух линий на тест-полоске является положительным результатом теста. При отсутствии анализита в образце конъюгат (Ат-метка) связывается с антивидовыми антителами только в контрольной зоне, образуя на тест-полоске одну линию (рис. 3.48).

Метод прямого ИХА используется для выявления различных гормонов (например, в тестах на беременность) и возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ.

Сэндвич-метод ИХА не подходит для определения низкомолекулярных веществ, так как для образования сэндвича Ат — Аг — Ат у антигена должны быть по крайней мере две антигенные детерминанты для связывания с антителом. Кроме того, из-за стерических затруднений образование такого двойного комплекса с низкомолекулярным антигеном маловероятно. Поэтому для анализа небольших молекул, в том числе молекул наркотических веществ, используется другой метод — непрямой конкурентный ИХА.

Непрямой конкурентный ИХА. Основан данный вариант ИХА на конкуренции определяемого антигена (аналита) и иммобилизованного конъюгата анализит : белок-носитель за ограниченное количество центров связывания специфических антител, содержащихся в конъюгате Ат-метка (рис. 3.49).

Устройство тест-полоски в этом случае отличается тем, что в тестовой зоне иммобилизованы искусственные антигены (конъюгаты Аг : белок-носитель), способные специфически связываться со свободными антителами. При нанесении образца, содержащего анализируемый антиген, последний связывается с мечеными антителами. Далее иммунный комплекс, проходя через тестовую зону, не может связаться с иммобилизованным конъюгатом Аг : белок-носитель,

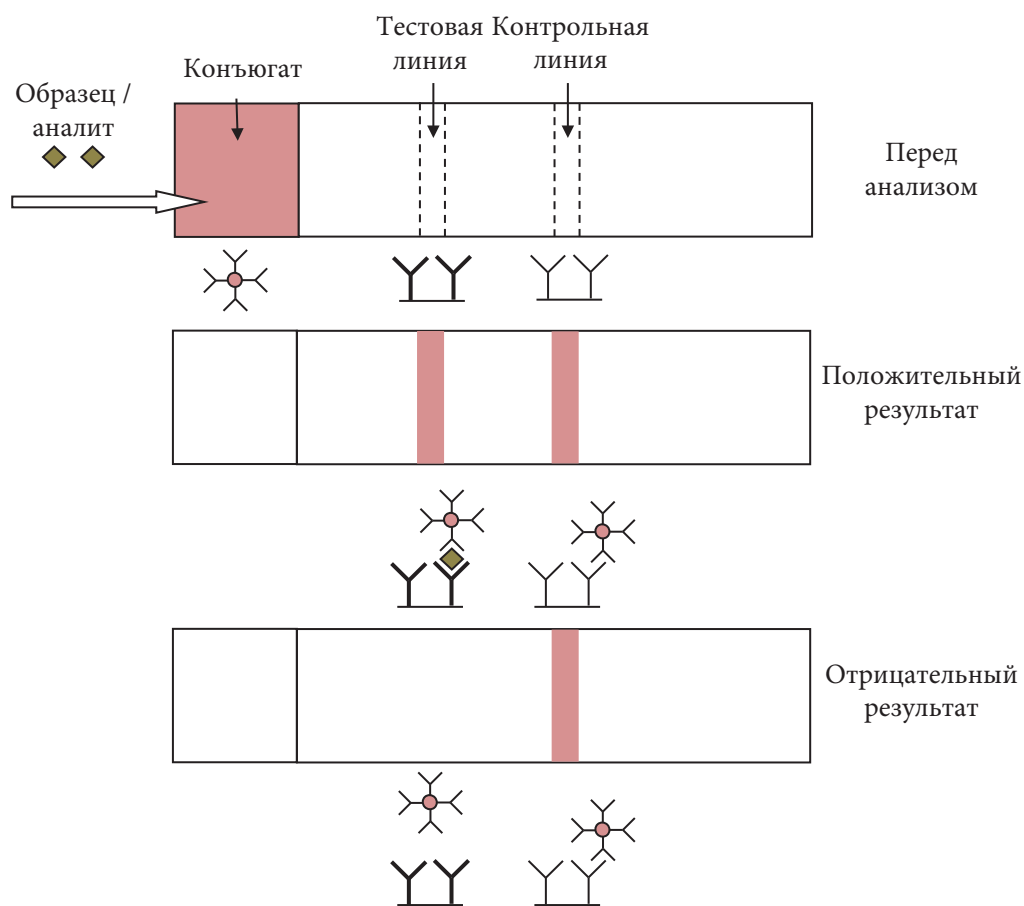


Рис. 3.48. Схема прямого иммунохроматографического анализа (сэндвич-метода ИХА)

так как активные центры меченых антител в составе комплекса уже заняты молекулами аналита. Затем, уже в контрольной зоне, иммунный комплекс связывается антивидовыми антителами, образуя одну окрашенную линию.

При отсутствии в образце определяемого вещества часть свободных меченых антител связывается в тестовой зоне с иммобилизованным конъюгатом Аг : белок-носитель, давая окрашенную линию. Не связавшиеся меченые антитела попадают в контрольную зону с иммобилизованными антивидовыми антителами и связываются там, образуя вторую окрашенную линию.

Таким образом, наличие двух окрашенных линий (тестовой и контрольной) является отрицательным результатом анализа.

Результат теста определяется визуально или путем компьютерной обработки отсканированного изображения. При отсутствии на полоске контрольной линии результат теста является недействительным, поскольку этот факт может свидетельствовать либо о незавершенности процедуры анализа, либо о том,

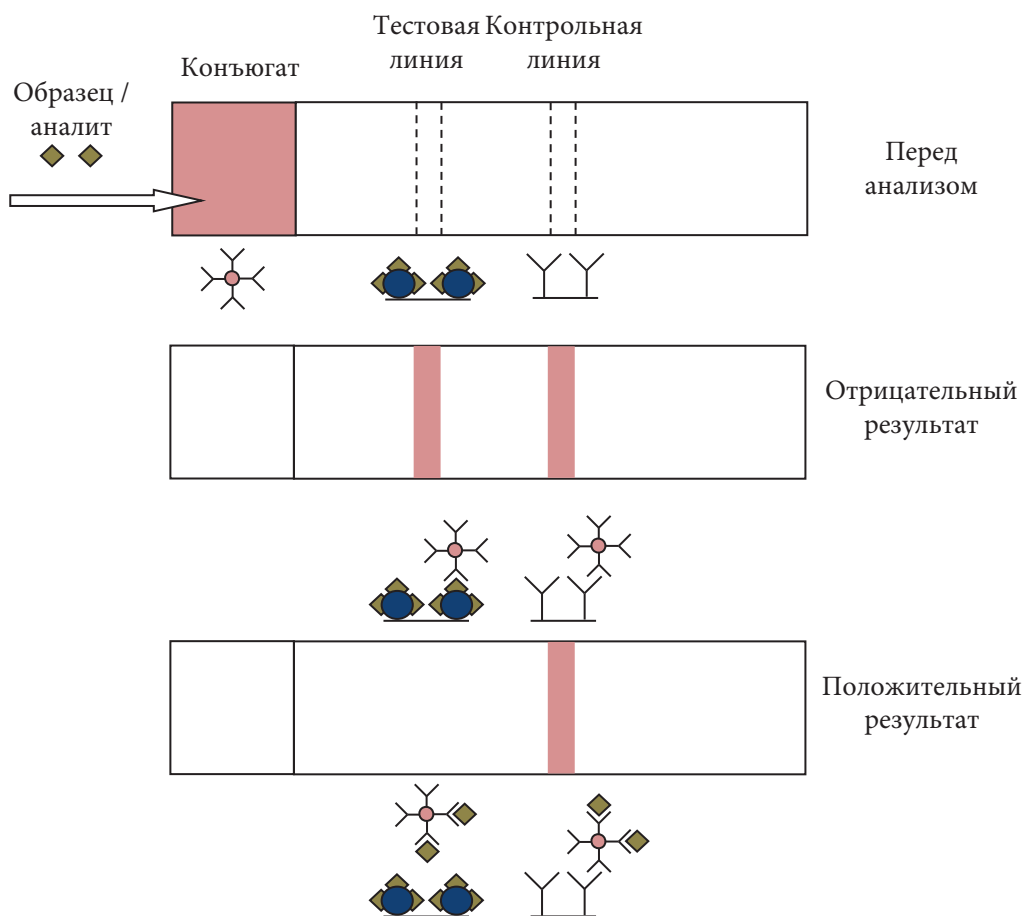


Рис. 3.49. Схема непрямого конкурентного иммунохроматографического анализа

что иммунохимическая реакция не прошла должным образом по какой-либо причине (из-за испортившихся иммунореагентов или несоблюдения инструкции по применению теста).

Непрямой конкурентный иммунохроматографический анализ используется для выявления низкомолекулярных соединений, в том числе метаболитов наркотических соединений в моче, жидкости ротовой полости, экстрактах тканей.

К преимуществам ИХА следует отнести:

- быстроту и легкость в использовании;
- малые объемы образца, отсутствие необходимости в пробоподготовке;
- дешевизну для производителя и потребителя;
- возможность производства тестов в больших объемах;
- простоту чтения и интерпретации результата;

- высокую чувствительность и воспроизводимость;
- возможность количественного определения интересующих веществ;
- возможность использования портативных ридеров, совместимых с компьютером;
- возможность мультианализа.

В связи с самым широким спектром преимуществ по сравнению с другими скрининговыми методами иммунохроматографический анализ получил широкое применение и занимает на мировом рынке диагностики лидирующую позицию.

ИХА применяется в таких областях медицины и народного хозяйства, как:

- медицинская диагностика;
- банки крови и плазмы;
- судебная медицина;
- экологический мониторинг;
- промышленность (контроль качества и безопасности, идентификация продукта);
- продовольствие;
- сельское хозяйство, агрономия;
- аквакультуры;
- ветеринария.

Однако иммунохроматографический анализ не лишен недостатков в плане надежности, чувствительности и экономичности тестов. Надежность и чувствительность зависят, во-первых, от качества используемых в тесте моноклональных антител, а во-вторых — от концентрации антигена в биоматериале. Качество моноклональных антител зависит от способов их получения, очистки и фиксации на носителе. Концентрация антигена — от стадии заболевания и количества биоматериала. Температура, от которой зависит скорость взаимодействия антитела с антигеном, важна только для времени постановки теста. Понятно, что использовать полоски при температуре ниже точки замерзания воды, составляющей основную часть биоматериала, не имеет смысла.

Тест-полоски для иммунохроматографического анализа имеют сложное строение, и процесс разработки каждого метода ИХА является чрезвычайно трудоемким и высокотехнологичным.

Иммунохроматографическая тест-полоска (рис. 3.50) состоит из следующих основных элементов: пластиковой подложки, на которую наклеены все остальные компоненты теста; фильтра (прокладки для образца); прокладки или мембраны для конъюгата; хроматографической нитроцеллюлозной мембраны, содержащей одну или несколько зон захвата иммунных комплексов и контрольную зону захвата; мембраны абсорбции (впитывающей прокладки). Тест-полоска может быть помещена в пластиковый корпус, в котором имеются приемное и тестовое «окна».

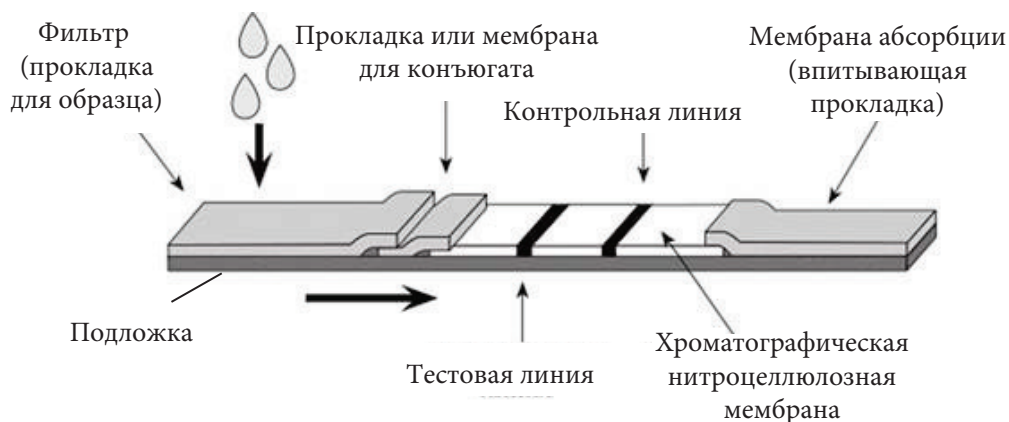


Рис. 3.50. Строение иммунохроматографической тест-полоски

Подложка — это пластиковый лист, имеющий клейкое покрытие. При выборе подложки необходимо обращать внимание на качество клея (это может напрямую влиять на характеристики хромотографической мембраны, которая будет приклеена на подложку) и удобство покрывающей пленки (что обеспечивает точность фиксации компонентов полоски на подложке).

Все компоненты тест-полоски приклеиваются на пластиковую подложку.

Фильтры выпускаются из различных пористых материалов: целлюлозы, стекловолокна, тканых сит. При выборе материала фильтра для образца необходимо руководствоваться теми функциями, которые должен выполнять фильтр:

- впитать достаточное количество образца и доставить его в прокладку или мембрану для конъюгата;
- довести значение pH образца до оптимального;
- увеличить или уменьшить вязкость образца для достижения оптимальной скорости его прохождения по хромотографической мембране;
- повысить способность образца растворить конъюгат;
- уменьшить забивку хромотографической мембраны посредством добавления забивки в фильтр (прокладку для образца).

Хромотографическая мембрана — самый важный элемент иммунохроматографической полоски. На ней осуществляется как иммунохимическая реакция, так и разделение и связывание иммунореагентов в тестовой и контрольной зонах. Это самая длинная зона тест-полоски, именно здесь иммунореагенты проходят максимальный путь в латеральном потоке.

Мембраны для конъюгатов производят из стекловолокна, целлюлозы, поверхностно модифицированного полиэфира или искусственных волокон. К этому элементу тест-полоски предъявляются два требования: высокая адсорбционная способность и легкость «смывания» конъюгата (то есть при прохождении жидкости конъюгат должен хорошо десорбироваться из мембраны).

При этом в процессе сушки мембраны после нанесения раствора конъюгата не должно происходить изменения конформации антител и разрушения структуры конъюгата.

Мембраны для ИХА изготавливают из нитроцеллюлозы (наиболее распространенный материал, используется в 99 % выпускаемых тест-полосок); нейлона; поливинилиденфторида; полиэфирсульфона; стекловолна.

При выборе материала для хроматографической мембраны необходимо учитывать, что последняя должна обладать гидрофильностью и способностью связывать белки.

Гидрофильность необходима для того, чтобы поток жидкости проходил через мембрану. Обеспечивается гидрофильность выбором материала, а также использованием ПАВ.

Способность хроматографической мембраны связывать белки нужна для формирования тестовой и контрольной линий на мембране. Требуется закрепить белковые конъюгаты таким образом, чтобы они не смылись латеральным потоком. Белки «прикрепляются» к мембране с помощью электростатического взаимодействия: диполи, содержащиеся в нитроцеллюлозе, связывают диполи белков.



Для лучшего закрепления белков на мембране после нанесения растворов конъюгатов и антител используют «забивку», или блокировку, мембраны: ее обрабатывают раствором инертного белка, чтобы занять все вакантные поры, в которые могли бы мигрировать молекулы белковых конъюгатов и антител, находящихся на контрольной и тестовой линиях. Кроме того, в растворах белков необходимо использовать буфер с нужной кислотностью, чтобы обеспечить максимальное электростатическое взаимодействие диполей нитроцеллюлозы и белков.

В качестве меток при проведении иммунохроматографического анализа используются различные частицы.

1. Красящие вещества (наночастицы коллоидного золота или углерода либо частицы окрашенного латекса). В этом случае осуществляются либо визуальная детекция результата, либо его приборное рефлектометрическое определение (например, сканирование). Применение различных красящих меток, присоединенных к частицам латекса, позволяет проводить мультианализ, в котором линии разного цвета соответствуют различным анализам. Наиболее часто используемой меткой являются наночастицы коллоидного золота, которые образуют линии темно-бурого (или темно-розового) цвета.

2. Флуоресцентные, фосфоресцентные и биолюминисцентные метки, ковалентно связанные с частицами латекса. Эти метки используются только в приборных вариантах ИХА, когда результат регистрируется специальным ридером. Наиболее распространенные метки — флуоресцентные.

3. Парамагнитные метки (также закрепленные на частицах латекса). Используются в ИХА с применением приборов, регистрирующих силу магнитного поля.

4. Ферментные метки. Используются по тому же принципу, что и при проведении иммуноферментного анализа. Ферментативная реакция регистрируется с помощью окрашивания субстратов, и результат анализа оценивается визуально или считывается с помощью ридера.

5. Новым направлением в разработке методов ИХА является использование липосом в качестве носителей различных меток (красящих, флуоресцентных, ферментных и пр.).

Часто, особенно в случаях, когда недоступны большие количества биобразца для анализа (например, для определения наркотических веществ в слюне), используются тест-полоски в пластиковой кассете.

Разработка технологических стадий иммунохроматографического анализа является процессом наукоемким, высокотехнологичным и многостадийным: он включает подбор материалов, реагентов и условий проведения анализа на нескольких этапах. Современные материалы и возможность тщательного соблюдения технологических требований при производстве ИХА-тестов позволяют проводить даже количественное определение интересующих веществ. В этом случае детекция результата осуществляется с помощью специальных считывающих устройств — ридеров для ИХА. В зависимости от типа метки данные устройства проводят детекцию рефрактометрическую, флуоресцентную или магнитную.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Галактионов В. Г. Иммунология : учебник для студентов вузов / В. Г. Галактионов. — Москва : Академия, 2004. — 528 с. — ISBN 5-7695-1260-1.

Иммунодиагностические реакции : учебное пособие / сост. Г. К. Давлетшина, З. Г. Габидуллин, А. А. Ахтариева [и др.] ; ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. — Уфа : [б. и.], 2016. — 84 с.

Иммунология : учебное пособие / П. А. Красочко, Ю. Н. Федоров, В. С. Прудников [и др.] ; под ред. П. А. Красочко, Н. Д. Лисова. — Минск : Аверсэв, 2005. — 128 с. — ISBN 985-478-497-5.

Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём ; пер. с нем. Л. В. Козлова, Е. С. Левиной, П. Д. Решетова. — Москва : Мир, 2000. — 469 с. — ISBN 5-03-003304-1 (рус.), ISBN 3-13-759402-2 (нем.).

Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учебник / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, А. С. Быков [и др.] ; под ред. А. А. Воробьева, Ю. С. Кривошеина. — Москва : Мастерство, 2001. — 224 с. — ISBN 5-294-00053-9.

Рабсон А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз ; пер. с англ. Л. А. Певницкого. — Москва : Мир, 2006. — 320 с. — ISBN 5-03-003744-6.

Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер. с англ. В. И. Кандро-ра, А. Н. Маца, Л. А. Певницкого, М. А. Серовой. — Москва : Мир, 2000. — 592 с. — ISBN 5-03-003305-X (рус.), ISBN 0-7234-2918-9 (англ.).

Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. — Москва : Высшая школа, 1991. — 288 с. — ISBN 5-06-000644-1.

Черешнев В. А. Иммунология : учебник / В. А. Черешнев, К. В. Шмагель. — Москва : Центр стратегического партнерства, 2014. — 520 с. — ISBN 978-5-995814-1-8.

Шмагель К. В. Гуморальные факторы иммунитета / К. В. Шмагель, В. А. Черешнев ; ГОУ ВПО ПГМА им. акад. Е. А. Вагнера Росздрава. — Пермь : [б. и.], 2011. — 247 с. — ISBN 978-5-7812-0412-0.

Учебное издание

Максимова Надежда Евгеньевна
Мочульская Наталия Николаевна
Емельянов Виктор Владимирович

ОСНОВЫ ИММУНОАНАЛИЗА

Учебное пособие

Заведующий редакцией М. А. Овечкина
Редактор *Е. И. Маркина*
Корректор *Е. И. Маркина*
Компьютерная верстка *В. К. Матвеев*

Подписано в печать 30.11.2021 г. Формат 70 × 100 $\frac{1}{16}$.
Бумага офсетная. Цифровая печать. Усл. печ. л. 11,93.
Уч.-изд. л. 9,2. Тираж 30 экз. Заказ 175

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio.marina.ovechkina@mail.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>



МАКСИМОВА НАДЕЖДА ЕВГЕНЬЕВНА

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры иммунохимии Уральского федерального университета. Сфера научных интересов — биохимия продуктов питания, разработка новых иммунохимических методов анализа.



МОЧУЛЬСКАЯ НАТАЛИЯ НИКОЛАЕВНА

Кандидат химических наук, доцент кафедры иммунохимии Уральского федерального университета. Сфера научных интересов — химия гетероциклов, разработка методов синтеза и иммунохимического анализа антибактериальных препаратов.



ЕМЕЛЬЯНОВ ВИКТОР ВЛАДИМИРОВИЧ

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры иммунохимии, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики Уральского федерального университета. Сфера научных интересов — биохимия сахарного диабета, разработка новых противодиабетических средств.